

METHOD FOR DETERMINING DENATURATED LDL

Patent number:	JP2002017353	Also published as:	
Publication date:	2002-01-22	<input checked="" type="checkbox"/> EP1046652 (A1)	
Inventor:	SAWAMURA TATSUYA; SUMIYA MAKOTO; MAZAKI TOMOO	<input checked="" type="checkbox"/> WO9932520 (A1)	
Applicant:	JAPAN TOBACCO INC		
Classification:			
International:	C12N15/09; A61P3/06; A61P9/10; A61K38/00; A61K39/395; C07K1/22; C07K14/705; C07K16/46; C07K17/00; C07K19/00; C12N5/10; C12P21/02; G01N33/53		
European:			
Application number:	JP19980358170 19981216		
Priority number(s):			

Abstract of JP2002017353

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an assay method which can simply and highly sensitively detect and determine in an intact state a denaturated LDL such as oxidized LDL contained in the body fluid of a patient having contracted a disease such as arteriosclerosis or hyperlipemia and can clinically generally be used, and to provide a fused polypeptide which is useful not only as the ingredient of an agent for the assay method but also as a medicine for preventing and treating the disease such as the arteriosclerosis or the hyperlipemia.

SOLUTION: The denaturated LDL such as oxidized LDL contained in the body fluid of a patient having contracted the disease such as arteriosclerosis or hyperlipemia can simply and highly sensitively be determined by an immunoassay method using a fused polypeptide comprising the extracellular region of an oxidized LDL receptor and a part of the heavy chain constant region of an immunoglobulin. The fused polypeptide is also highly useful as the active ingredient of a medicine for preventing and treating the disease such as arteriosclerosis or hyperlipemia.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-17353

(P2002-17353A)

(43)公開日 平成14年1月22日(2002.1.22)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
A 6 1 P 3/06		A 6 1 K 31/00	6 0 3 L 4 B 0 6 4
9/10			6 0 9 G 4 B 0 6 5
A 6 1 K 38/00		39/395	W 4 C 0 8 4
39/395		C 0 7 K 1/22	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 請求項の数31 O L (全 39 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願平10-358170	(71)出願人	000004569 日本たばこ産業株式会社 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号
(22)出願日	平成10年12月16日(1998.12.16)	(72)発明者	沢村 達也 京都府京都市左京区北白川追分町80-1 208
(31)優先権主張番号	特願平9-364981	(72)発明者	角谷 真 大阪府高槻市紫町1-1 日本たばこ産業 株式会社医薬総合研究所内
(32)優先日	平成9年12月19日(1997.12.19)	(72)発明者	眞崎 知生 京都府京都市左京区岩倉花園町541-32
(33)優先権主張国	日本 (J P)	(74)代理人	100100217 弁理士 大東 輝雄
(31)優先権主張番号	特願平10-349648		
(32)優先日	平成10年12月9日(1998.12.9)		
(33)優先権主張国	日本 (J P)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 変性LDLの定量方法

(57)【要約】

【課題】 動脈硬化症や高脂血症等の疾患に罹患した患者の体液中に存在する酸化LDL等の変性LDLを、インタクトな状態で簡便かつ高感度で検出及び定量でき臨床上で汎用可能なアッセイ方法、並びに該アッセイ方法の構成要素としてだけでなく動脈硬化症や高脂血症等の疾患及び治療に有用な融合ポリペプチドを提供する。

【解決手段】 酸化LDL受容体の細胞外領域と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の一部からなる融合ポリペプチドを用いた免疫学的アッセイ法を用いることにより、動脈硬化症や高脂血症等の疾患に罹患した患者の体液中に存在する酸化LDL等の変性LDLを、簡便かつ高感度で定量できる。また該融合ポリペプチドは、動脈硬化症や高脂血症等の疾患の予防及び治療のための医薬品の有効成分としても極めて有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳動物の酸化LDL受容体の細胞外領域と哺乳動物の免疫グロブリン(Ig)の重鎖の一部とからなる融合ポリペプチド。

【請求項2】 哺乳動物の免疫グロブリンが、ヒトの免疫グロブリンであることを特徴とする請求項1に記載の融合ポリペプチド。

【請求項3】 免疫グロブリンが、IgGであることを特徴とする請求項1または請求項2に記載の融合ポリペプチド。

【請求項4】 免疫グロブリンの重鎖の一部が、免疫グロブリンの重鎖の定常領域または定常領域の一部であることを特徴とする請求項1乃至請求項3のいずれかに記載の融合ポリペプチド。

【請求項5】 定常領域の一部が、IgG、IgAまたはIgDのヒンジ領域、C2ドメイン及びC3ドメインからなることを特徴とする請求項4に記載の融合ポリペプチド。

【請求項6】 定常領域の一部が、IgMまたはIgEのC2ドメイン、C3ドメイン及びC4ドメインからなることを特徴とする請求項4に記載の融合ポリペプチド。

【請求項7】 哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖の一部が、ヒトのIgGのヒンジ領域、C2ドメイン及びC3ドメインからなることを特徴とする請求項1に記載の融合ポリペプチド。

【請求項8】 哺乳動物の酸化LDL受容体が、ヒトの酸化LDL受容体であることを特徴とする請求項1乃至請求項7のいずれかに記載の融合ポリペプチド。

【請求項9】 ヒトの酸化LDL受容体が、配列番号1に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドであることを特徴とする請求項8に記載の融合ポリペプチド。

【請求項10】 哺乳動物の酸化LDL受容体が、ウシの酸化LDL受容体であることを特徴とする請求項1乃至請求項7のいずれかに記載の融合ポリペプチド。

【請求項11】 ウシの酸化LDL受容体が、配列番号2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドであることを特徴とする請求項10に記載の融合ポリペプチド。

【請求項12】 配列番号3に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有する融合ポリペプチド。

【請求項13】 請求項1乃至請求項12のいずれかに記載の融合ポリペプチドをコードするDNA。

【請求項14】 配列番号4または配列番号10のいずれかに記載の塩基配列を有するDNA。

【請求項15】 請求項13または請求項14に記載のDNAを含むことを特徴とするベクター。

【請求項16】 請求項15に記載のベクターで形質転

換されていることを特徴とする形質転換細胞。

【請求項17】 不溶性担体に請求項1乃至請求項12のいずれかに記載の融合ポリペプチドが固定化されていることを特徴とする融合ポリペプチド固定化不溶性担体。

【請求項18】 不溶性担体が、プレート、試験管、チューブ、ビーズ、ボール、フィルター及びメンブレンからなる群から選ばれる不溶性担体であることを特徴とする請求項17に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体。

【請求項19】 不溶性担体が、フィルター若しくはメンブレン、またはアフィニティークロマトグラフィーに用いられる不溶性担体であることを特徴とする請求項17に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体。

【請求項20】 請求項17若しくは請求項18に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体、または請求項1乃至請求項12のいずれかに記載の融合ポリペプチドを含んでなることを特徴とし、酸化LDLの検出または定量に用いられるキット。

【請求項21】 請求項17若しくは請求項18に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体、または請求項1乃至請求項12のいずれかに記載の融合ポリペプチドを用いることを特徴とするイムノアッセイにより酸化LDLを検出または定量する方法。

【請求項22】 少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含むイムノアッセイにより酸化LDLを検出または定量する請求項21に記載の方法。

(a) 請求項17または請求項18に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体に、試料を反応せしめる工程。

(b) 該融合ポリペプチド固定化不溶性担体と該試料中に含まれる酸化LDLとの結合により形成される複合体に、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された抗体であって、酸化LDLまたはアポリポrotein Bに反応性を有する抗体を反応せしめる工程。

【請求項23】 少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含むイムノアッセイにより酸化LDLを検出または定量する請求項21に記載の方法。

(a) 単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された抗体であって、酸化LDLまたはアポリポrotein Bに反応性を有する抗体と、試料を反応せしめる工程。

(b) 該抗体と該試料中に含まれる酸化LDLとの結合により形成される複合体と、請求項17または請求項18に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体を反応せしめる工程。

【請求項24】 少なくとも下記(a)の工程を含むイムノアッセイにより酸化LDLを検出または定量する請求項21に記載の方法。

(a) 請求項17または請求項18に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体、単独または他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された抗体であって、酸化LDLまたはアポリポrotein Bに反応性を有する抗体、及び試料を含む混合物を反応せしめる工程。

【請求項25】 少なくとも下記(a)の工程を含むイムノアッセイにより酸化LDLを検出または定量する請求項21に記載の方法。

(a) 請求項17または請求項18に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体に、試料、並びに単独または他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された酸化LDLの標準物質を反応せしめる工程。

【請求項26】 請求項17または請求項19に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体を含んでなることを特徴とし、酸化LDLの分離または精製に用いられるキット。

【請求項27】 請求項17または請求項19に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いることを特徴とする酸化LDLを分離または精製する方法。

【請求項28】 アフィニティークロマトグラフィーがアフィニティークラムクロマトグラフィーである請求項27に記載の酸化LDLの精製方法。

【請求項29】 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するヒトの酸化LDL受容体の細胞外領域とヒトの免疫グロブリンの重鎖の一部とからなる融合ポリペプチド、及び薬学的に許容されうる担体とを含んでなる医薬組成物。

【請求項30】 免疫グロブリンの重鎖の一部が、免疫グロブリンの重鎖の定常領域または定常領域の一部であることを特徴とする請求項29に記載の医薬組成物。

【請求項31】 医薬組成物が、動脈硬化症または高脂血症の予防または治療のために用いられるものであることを特徴とする請求項29または請求項30に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、哺乳動物の酸化LDL受容体の細胞外領域と哺乳動物の免疫グロブリン(Ig)の重鎖の一部とからなる融合ポリペプチド、該融合ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換細胞、該融合ポリペプチドを固定化してなる融合ポリペプチド固定化不溶性担体、酸化LDLの検出、定量、分離または精製に用いられるキット、酸化LDLを検出、定量、分離または精製する方法、該融合ポリペプチドを含んでなる医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 あらゆる組織及び血中に存在する種々形態のコレステロール(遊離型、長鎖脂肪酸型、及びエステル型)は、主に肝臓での生合成に由来する。肝臓で生合成された遊離型コレステロールは、超低密度リポ蛋白(VLDL)に取り込まれ、血中でリポ蛋白リパーゼ(LPL)及び肝性トリグリセリドリパーゼ(HTGL)の作用により、中間密度リポ蛋白(IDL)を経た後、低密度リポ蛋白(LDL; Low-Density Lipoprotein)へと代謝される。このLDLは、LDL受容体を介して末梢細胞へと取り込まれることにより、生体の細胞膜の構成において重要な役割を果たしている。

【0003】 しかしながら、このLDLが、血管内皮細胞などの細胞による作用、種々の化学的・物理的な要因、あるいは熱などの種々の要因により酸化変性を受けると、酸化LDL(Oxidized LDL)と呼ばれる変性LDLが血中に生ずることとなる。血流中には十分量の酸化物質があるため、もともと血流中には酸化LDLが生じにくくはあるが、例え生じた場合であっても、それらのほとんどは肝臓で代謝される。

【0004】 一方、血管内皮下及び血管壁では、血管内皮細胞やマクロファージなどの細胞依存性化学変性並びに Fe^{3+} などの作用による細胞非依存性化学変性により酸化LDLが生ずるが、血流中での生成の場合と異なり、血管内皮下及び血管壁で生じた酸化LDLは、マクロファージの細胞内に蓄積されることとなる。酸化LDLのマクロファージ細胞内への蓄積は、そのようにして生成した酸化LDLが、種々の変性LDL(酸化LDL、アセチルLDL、サクシニルLDL、マロンジアルデヒドLDL)に対する受容体であるマクロファージの細胞表面のスキャベンジャー受容体を介して細胞内に取り込まれることによるものである(Nature, Vol.343, p.531-535, 1990; Nature, Vol.343, p.570-572, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.87, p.9133-9137, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.87, p.8810-8814, 1990; Curr. Opin. Lipodol., Vol.2, p.295-300, 1991; 及びJ. Clin. Invest., Vol.90, p.1450-1457, 1992)。

【0005】 このマクロファージスキャベンジャー受容体は、LDL受容体と異なり、細胞内のコレステロールの量に依存した受容体のダウンレギュレーションを受けない。従って、血管内皮下や血管壁に潜り込んだマクロファージは、多量の変性LDLを取込むことにより細胞内に多量のコレステロールを蓄積し、泡沫細胞化することとなる(「分子動脈硬化学」、第4章「炎症細胞 1. スキャベンジャー受容体」、第249-258頁、1995年、メディカルレビュー社発行)。

【0006】 一方、上述の血管内皮下や血管壁に潜り込んだマクロファージは、血流中、血管内皮下あるいは血管壁などの種々部位で生じた酸化LDLの生成シグナルに応答して、血流中から移入してきたマクロファージに

由来する。即ち、酸化LDLが、血流中のマクロファージや単球に対して走化性を示し、血管内皮細胞上に単球やマクロファージを集結させる性質、集結した単球やマクロファージの血管内皮下への潜り込み並びに血管壁へ引き込みを誘導する性質、引き込まれた単球のマクロファージへ分化を誘導する性質を誘導、さらに分化を完了したマクロファージの遊走を抑制する性質を有することによるものである。

【0007】この単球やマクロファージの血管内皮細胞への集結には、最近、本発明者らにより同定された血管内皮細胞上に発現している酸化LDL受容体 (Oxidized-LDL Receptor, Ox-LDL ReceptorまたはLOX-1と称される。Nature, Vol.386, p.73-77, 1997、及び脂質生化学研究, Vol.39, p.83-84, 1997) が深く関与していることが明らかにされつつある。これまでの研究から、血流中の酸化LDLが、酸化LDL受容体を介して血管内皮細胞に取り込まれると、細胞内での一酸化窒素 (NO) の産生が阻害され、この結果、血管内皮細胞の表面に細胞接着分子の発現が誘導されることが実験的に証明されている。このことから、細胞接着分子が発現する結果、マクロファージや単球が、血管内皮細胞上にトラップされ、トラップされたマクロファージや単球が、血管内皮下及び血管壁に潜り込むものと考えられている。そうして、血管内皮下及び血管壁に潜り込んだマクロファージは、上述したようにマクロファージスカベンジャー受容体を介した酸化LDLの取込みにより泡沫細胞化するものと考えられている。

【0008】この血管壁でのマクロファージの泡沫細胞化は、動脈硬化症の主な原因であることから、動脈硬化症の発症の引金は、上述した単球やマクロファージの血管内皮細胞への集結であると考えられている。この単球やマクロファージの血管内皮細胞への集結に深く関与する酸化LDL受容体は、多くの研究者が長年の間求め続けた結果、本発明者らが1997年に初めて同定に成功し、脚光を浴びているものである。酸化LDL受容体については、上述した性状及び機能以外の詳細な研究は、目下、精力的に進められているところであり、酸化LDL受容体についての報告はほとんどなく、全く新規な技術分野である。

【0009】このような新規かつ動脈硬化症等の疾患の予防及び治療において医学的に重要な酸化LDL受容体に関する研究開発の遂行においては、血液等の体液に含まれる酸化LDLをはじめ、様々なリガンドと酸化LDL受容体との相互作用を究明することができるアッセイ系が必要であるが、未だ全く提供されていない。酸化LDL受容体のような細胞膜貫通蛋白のためのアッセイ系を構築する場合には、例えば、その細胞外領域ポリペプチドを可溶性蛋白として製造する必要がある。昨今の遺伝子工学技術を用いることにより、細胞外領域ポリペプチドのみを組換え可溶性蛋白として製造することも可

能であるが、該組換え蛋白の精製及び該組換え蛋白を用いたアッセイ (検出、定量) における利便性及び汎用性を考慮すると、該細胞外領域を他の蛋白 (例えば、免疫グロブリンのFcといった免疫グロブリンの一部) との可溶性融合ポリペプチドとして製造することが好ましい (特開平5-247094号公報、特表平3-502283号公報、及び特開平6-160395号公報など)。

【0010】そのような融合ポリペプチドとしての融合ポリペプチドは、アッセイ系の構成要素として有用だけでなく、酸化LDL等の変性LDLの分離及び精製においても使用可能であり、またそれ自体が医薬品の有効成分となり得る。しかしながら、酸化LDL受容体については、そのような種々の有用性を有する融合ポリペプチドは、何ら提供されていない。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】動脈硬化症の発症のメカニズムは未だ完全に解明されておらず、また動脈硬化症の有効な予防薬及び治療薬も未だ提供されていない。上述のとおり、酸化LDL受容体は、動脈硬化症等の原因となる血管壁でのマクロファージの泡沫化進行過程における初期の生体反応である単球やマクロファージの血管内皮細胞への集結を誘導する引金となる血中酸化LDLの取込みを担うことから、酸化LDL受容体の機能、並びに血中に含まれる酸化LDLをはじめとした様々なリガンドと酸化LDL受容体との相互作用を解明することは、動脈硬化症や高脂血症等の疾患の予防及び治療に有用な薬剤開発において極めて重要な意義を有する。

【0012】即ち、本発明は、このような目的を達成するために必須である酸化LDL受容体の可溶性融合ポリペプチド (可溶性酸化LDL受容体融合ポリペプチド) を世界に先駆けて初めて提供するものである。当該可溶性酸化LDL受容体融合ポリペプチドは、同目的達成のために必須な、哺乳動物 (例えば、健康人及び患者等) の体液中 (例えば、血中) の酸化LDL等のリガンドのアッセイ (検出、定量、分離、及び精製など) の構成要素として有用だけでなく、それ自体が動脈硬化症や高脂血症等の疾患の予防及び治療のための医薬品の有効成分として有用である。より詳細には、動脈硬化症や高脂血症等の疾患に罹患した患者の体液中に存在する酸化LDL等の変性LDLを、インタクト (intact) な状態で簡便かつ高感度で検出及び定量でき、臨床上で汎用可能な検出及び定量方法及び検出方法、並びに該方法に用いられるキットを提供するものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、動脈硬化症等の疾患の予防及び治療において医学的に重要な酸化LDL受容体に関する研究開発の遂行において用いるための可溶性酸化LDL受容体に関して鋭意研究した結果、遺伝子工学技術を用いて、酸化LDL受容体の細胞外領域を免疫グロブリンの一部 (例えば、Fc領域) と

の融合ポリペプチドとして製造することにより、酸化LDL受容体を可溶性融合蛋白として得ることに成功し、本発明を完成するに至った。該融合ポリペプチドを、ファクターXa等のプロテアーゼにより処理することにより酸化LDL受容体の細胞外領域のみを可溶性ポリペプチドとして製造することもできる。

【0014】該酸化LDL受容体の可溶性融合ポリペプチドは、哺乳動物（例えば、健康人及び患者等）の体液中（例えば、血中）の酸化LDL等のリガンドのアクセシ（検出、定量）及び該リガンドの分離及び精製における構成要素としてだけでなく、動脈硬化症や高脂血症等の疾患の予防及び治療のための医薬品の有効成分として極めて有用である。また、前記可溶性酸化LDL受容体を、IgG等の免疫グロブリンの定常領域の一部（例えば、Fc）との融合ポリペプチドとして製造することにより、該融合ポリペプチドを、該免疫グロブリン断片に特異的に結合するというプロテインAの性質を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより容易に精製することが可能である。さらに、種々の免疫グロブリンのFcに対する種々の抗体が提供されていることから、該Fcに対する抗体を用いて、該融合ポリペプチドのイムノアッセイを簡便に行うことができる。

【0015】即ち、本発明は、下記（1）乃至（31）に記載されるとおりの発明である。

（1）哺乳動物の酸化LDL受容体の細胞外領域と哺乳動物の免疫グロブリン（Ig）の重鎖の一部とからなる融合ポリペプチド。

（2）哺乳動物の免疫グロブリンが、ヒトの免疫グロブリンであることを特徴とする前記（1）に記載の融合ポリペプチド。

（3）免疫グロブリンが、IgGであることを特徴とする前記（1）または前記（2）に記載の融合ポリペプチド。

（4）免疫グロブリンの重鎖の一部が、免疫グロブリンの重鎖の定常領域または定常領域の一部であることを特徴とする前記（1）乃至（3）のいずれかに記載の融合ポリペプチド。

（5）定常領域の一部が、IgG、IgAまたはIgDのヒンジ領域、C2ドメイン及びC3ドメインからなることを特徴とする前記（4）に記載の融合ポリペプチド。

（6）定常領域の一部が、IgMまたはIgEのC2ドメイン、C3ドメイン及びC4ドメインからなることを特徴とする前記（4）に記載の融合ポリペプチド。

（7）哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖の一部が、ヒトのIgGのヒンジ領域、C2ドメイン及びC3ドメインからなることを特徴とする前記（1）に記載の融合ポリペプチド。

（8）哺乳動物の酸化LDL受容体が、ヒトの酸化LDL受容体であることを特徴とする前記（1）乃至（7）

のいずれかに記載の融合ポリペプチド。

（9）ヒトの酸化LDL受容体が、配列番号1に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドであることを特徴とする前記

（8）に記載の融合ポリペプチド。

（10）哺乳動物の酸化LDL受容体が、ウシの酸化LDL受容体であることを特徴とする前記（1）乃至（7）のいずれかに記載の融合ポリペプチド。

（11）ウシの酸化LDL受容体が、配列番号2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドであることを特徴とする前記（10）に記載の融合ポリペプチド。

（12）配列番号3に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有する融合ポリペプチド。

（13）前記（1）乃至（12）のいずれかに記載の融合ポリペプチドをコードするDNA。

（14）配列番号4または配列番号10のいずれかに記載の塩基配列を有するDNA。

（15）前記（13）または（14）に記載のDNAを含むことを特徴とするベクター。

（16）前記（15）に記載のベクターで形質転換されていることを特徴とする形質転換細胞。

（17）不溶性担体に前記（1）乃至（12）のいずれかに記載の融合ポリペプチドが固定化されていることを特徴とする融合ポリペプチド固定化不溶性担体。

（18）不溶性担体が、プレート、試験管、チューブ、ビーズ、ボール、フィルター及びメンブレンからなる群から選ばれる不溶性担体であることを特徴とする前記

（17）に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体。

（19）不溶性担体が、フィルター若しくはメンブレン、またはアフィニティーカラムクロマトグラフィーに用いられる不溶性担体であることを特徴とする前記（17）に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体。

（20）前記（17）若しくは前記（18）に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体、または前記（1）乃至（12）のいずれかに記載の融合ポリペプチドを含んでなることを特徴とし、酸化LDLの検出または定量に用いられるキット。

（21）前記（17）若しくは前記（18）に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体、または前記（1）乃至（12）のいずれかに記載の融合ポリペプチドを用いることを特徴とするイムノアッセイにより酸化LDLを検出または定量する方法。

（22）少なくとも下記（a）及び（b）の工程を含むイムノアッセイにより酸化LDLを検出または定量する前記（21）に記載の方法。

（a）前記（17）または前記（18）に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体に、試料を反応せしめる工程。

(b) 該融合ポリペプチド固定化不溶性担体と該試料中に含まれる酸化LDLとの結合により形成される複合体に、単独または他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された抗体であって、酸化LDLまたはアポリポロテインBに反応性を有する抗体を反応せしめる工程。

(23) 少なくとも下記(a)及び(b)の工程を含むイムノアッセイにより酸化LDLを検出または定量する前記(21)に記載の方法。

(a) 単独または他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された抗体であって、酸化LDLまたはアポリポロテインBに反応性を有する抗体と、試料を反応せしめる工程。

(b) 該抗体と該試料中に含まれる酸化LDLとの結合により形成される複合体と、前記(17)または(18)に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体を反応せしめる工程。

(24) 少なくとも下記(a)の工程を含むイムノアッセイにより酸化LDLを検出または定量する前記(21)に記載の方法。

(a) 前記(17)または(18)に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体、単独または他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された抗体であって、酸化LDLまたはアポリポロテインBに反応性を有する抗体、及び試料を含む混合物を反応せしめる工程。

(25) 少なくとも下記(a)の工程を含むイムノアッセイにより酸化LDLを検出または定量する前記(21)に記載の方法。

(a) 前記(17)または(18)に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体に、試料、並びに単独または他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された酸化LDLの標準物質を反応せしめる工程。

(26) 前記(17)または(19)に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体を含んでなることを特徴とし、酸化LDLの分離または精製に用いられるキット。

(27) 前記(17)または(19)に記載の融合ポリペプチド固定化不溶性担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いることを特徴とする酸化LDLを分離または精製する方法。

(28) アフィニティークロマトグラフィーがアフィニティークラムクロマトグラフィーである前記(27)に記載の酸化LDLの精製方法。

(29) 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するヒトの酸化LDL受容体の細胞外領域とヒトの免疫グロブリンの重鎖の一部とからなる融合ポリペプチド、及び薬学的に許容されうる担体とを含んでなる医薬組成物。

(30) 免疫グロブリンの重鎖の一部が、免疫グロブリン

の重鎖の定常領域または定常領域の一部であることを特徴とする前記(29)に記載の医薬組成物。

(31) 医薬組成物が、動脈硬化症または高脂血症の予防または治療のために用いられるものであることを特徴とする前記(29)または(30)に記載の医薬組成物。

【0016】

【発明の実施の形態】以下、本発明の融合ポリペプチド及びDNA、本発明で用いられる抗体の一般的製造方法、並びに本発明で用いる語句の意味を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。本発明における「哺乳動物」とは、ヒト、ウシ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、及びモルモット等を意味し、好ましくは、ヒト、ウシ、ラット、マウスまたはハムスターであり、特に好ましくは、ヒトまたはウシである。本発明における「酸化LDL受容体」とは、前記「哺乳動物」に由来する酸化LDL受容体であって、配列番号5若しくは配列番号6に記載される塩基配列を有するDNAまたは該いずれかのDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるアミノ酸配列を有し、かつ酸化LDL等の変性LDLと結合するか、または該変性LDLの細胞内への取り込みにおいて作用する受容体を意味する。好ましくは、ヒトまたはウシの酸化LDL受容体であって、具体的には、配列番号1に記載されるアミノ酸配列と同一若しくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するヒト由来ポリペプチド

(ヒト酸化LDL受容体)、または配列番号2に記載されるアミノ酸配列と同一若しくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するウシ由来ポリペプチド(ウシ酸化LDL受容体)である。さらに好ましくは、配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有するヒト由来ポリペプチド(ヒト酸化LDL受容体)または配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するウシ由来ポリペプチド(ウシ酸化LDL受容体)である。特に、これら2つの酸化LDL受容体は、Nature (Vol. 386, p. 73-77, 1997)、脂質生化学研究 (Vol. 39, p. 83-84, 1997) 及び特開平9-98787号公報に報告されるとおりの受容体であり、Oxidized-LDL Receptor、Ox-LDL ReceptorまたはLOX-1とも称される。

【0017】ここで「ストリンジェントな条件下」としては、例えば、次のような条件を挙げることができる。例えば、50塩基以上のプローブを用い、0.9%NaCl下でハイブリダイゼーションを行う場合には、50%の解離を生ずる温度(T_m)の目安を下記計算式から求め、ハイブリダイゼーションの温度を下記計算式のように設定することができる。

$$T_m = 82.3^{\circ}\text{C} + 0.41 \times (\text{G} + \text{C}) \% - 500 / n - 0.61 \times (\text{フォルムアミド}) \%$$

(nはプローブの塩基数を示す。)

温度 = T_m - 25°C

また、100塩基以上のプロープ (G+C=40~50%の場合) を用いる場合には、 T_m が下記(1)及び(2)のように変化することを旨とする。

(1) 1%ミスマッチ毎に、 T_m が約1℃下がる。

(2) フォルムアミド1%毎に、 T_m が0.6~0.7℃下がる。従って、完全相補鎖の組み合わせの場合の温度条件は下記のようにすることができる。

(A) 65~75℃ (フォルムアミド無添加)

(B) 35~45℃ (50%フォルムアミド存在下)

また、不完全相補鎖の組み合わせの場合の温度条件は下記のようにすることができる。

(A) 45~55℃ (フォルムアミド無添加)

(B) 35~42℃ (30%フォルムアミド存在下)

また、23塩基以下のプロープを用いる場合の温度条件は、37℃とすることもできるし、また下記計算式を旨とすることもできる。

$$\text{温度} = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A+Tの数}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{C+Gの数}) - 5^{\circ}\text{C}$$

ここで「実質的に同一のアミノ酸配列を有する」とは、配列表配列番号1、2または3に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと実質的に同等の生物学的性質を有する限り、該アミノ酸配列中の複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が置換、欠失及び/または修飾されているアミノ酸配列を有するポリペプチド、並びに該アミノ酸配列に、複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドも本願発明の範囲に含まれることを意味する。

【0018】本発明における「細胞外領域」とは、前記のとおり定義された「酸化LDL受容体」の細胞外領域を意味する。ここで「細胞外領域」とは、以下のような意味を有するものである。即ち、前記のような酸化LDL受容体 (Oxidized-LDL Receptor, Ox-LDL ReceptorまたはLOX-1) に限らず、ほとんどの全ての受容体あるいは細胞膜表面分子は、細胞膜貫性タンパクに属し、膜の脂質二重層を1回または数回貫通する疎水性ペプチド領域により膜と連結し、全体として細胞外領域(extracellular region)、膜貫通領域(transmembrane region)及び細胞質領域(cytoplasmic region)の3つの主領域から構成される構造をとっている。さらにそのような膜貫通性タンパクは、モノマー(monomer)として、または、同一のアミノ酸配列を有するもう1本の鎖あるいは異なるアミノ酸配列を有する鎖とともにそれぞれホモダイマー(homodimer)、ヘテロダイマー(heterodimer)あるいはオリゴマー(oligomer)を形成して存在する。

【0019】本発明において用いられる「細胞外領域」とは、前述のような膜貫通性タンパクの全体構造のうち、該膜タンパクが連結している膜の外界側に存在する部分構造(部分領域)の全部または一部を意味し、換言すれば、膜内に取り込まれている領域(膜貫通領域)及び該

膜内の領域に引き続いて細胞質内に存在する領域(細胞内領域)以外の領域の全部または一部を意味する。具体的には、本発明における酸化LDLの1つであるウシLOX-1の細胞外領域とは、配列番号2に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1乃至56迄の領域を除いた領域の一部または全部を意味し、例えば、アミノ酸番号57乃至65のいずれかから引き続くアミノ酸番号270迄の領域の全部または一部を意味する。該領域は所望応じそのN末端及び/またはC末端に1乃至5のアミノ酸が付加されていてもよい。ヒトLOX-1の細胞外領域とは、配列番号1に記載されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1乃至59迄の領域を除いた領域の一部または全部を意味し、例えば、アミノ酸番号60乃至69のいずれかから引き続くアミノ酸番号273迄の領域の全部または一部を意味する。該領域は所望応じそのN末端及び/またはC末端に1乃至5のアミノ酸が付加されていてもよい。

【0020】本発明における「哺乳動物の免疫グロブリン(Ig)の重鎖の一部」とは、前述のような哺乳動物に由来する免疫グロブリンの重鎖(Heavy Chain, H鎖)の一部を意味し、特に好ましくはヒト由来の免疫グロブリンを意味する。該免疫グロブリンは、どのようなクラス及びサブクラスに属する免疫グロブリンであってもよく、具体的には、IgG (IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4)、IgM、IgA (IgA1及びIgA2)、IgD及びIgEを挙げることができる。好ましくは、IgG (IgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4)またはIgMである。本発明における特に好ましい例としては、ヒト由来のIgG (IgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4)に属する免疫グロブリンである。

【0021】図1に模式的に提示されるように、免疫グロブリンは、2つの相同な軽鎖(Light Chain, L鎖)と2つの相同な重鎖(Heavy Chain, H鎖)の4つの鎖が、ジスルフィド結合(S-S結合)で結合したY字形の構造単位を有する。軽鎖は、軽鎖可変領域(V_L)及び軽鎖定常領域(C_L)から構成される。重鎖は、重鎖可変領域(V_H)と重鎖定常領域(C_H)から構成される。

【0022】重鎖定常領域は、クラス(IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE)並びにサブクラス(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2)毎に各々固有のアミノ酸配列を有するいくつかのドメインから構成される。IgG (IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4)の重鎖は、N末端から順に、 V_H 、 C_H1 ドメイン、ヒンジ領域、 C_H2 ドメイン及び C_H3 ドメインから構成される。同様にIgG1の重鎖は、N末端から順に、 V_H 、 $C_{\gamma1}1$ ドメイン、ヒンジ領域、 $C_{\gamma1}2$ ドメイン及び $C_{\gamma1}3$ ドメインから構成される。IgG2の重鎖は、N末端から順に、 V_H 、C

γ_2 1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_2$ 2ドメイン及び $C\gamma_2$ 3ドメインから構成される。IgG3の重鎖は、N末端から順に、 V_H 、 $C\gamma_3$ 1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_3$ 2ドメイン及び $C\gamma_3$ 3ドメインから構成される。IgG4の重鎖は、N末端から順に、 V_H 、 $C\gamma_4$ 1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_4$ 2ドメイン及び $C\gamma_4$ 3ドメインから構成される。

【0023】IgAの重鎖は、N末端から順に、 V_H 、 $C\alpha_1$ 1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\alpha_2$ 2ドメイン及び $C\alpha_3$ 3ドメインから構成される。同様にIgA1の重鎖は、N末端から順に、 V_H 、 $C\alpha_1$ 1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\alpha_1$ 2ドメイン及び $C\alpha_1$ 3ドメインから構成される。IgA2の重鎖は、N末端から順に、 V_H 、 $C\alpha_2$ 1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\alpha_2$ 2ドメイン及び $C\alpha_2$ 3ドメインから構成される。IgDの重鎖は、N末端から順に、 V_H 、 $C\delta$ 1ドメイン、ヒンジ領域、 $C\delta$ 2ドメイン及び $C\delta$ 3ドメインから構成される。IgMの重鎖は、N末端から順に、 V_H 、 $C\mu$ 1ドメイン、 $C\mu$ 2ドメイン、 $C\mu$ 3ドメイン及び $C\mu$ 4ドメインから構成され、IgG、IgA及びIgDに見られるようなヒンジ領域を有しない。IgEの重鎖は、N末端から順に、 V_H 、 $C\epsilon$ 1ドメイン、 $C\epsilon$ 2ドメイン、 $C\epsilon$ 3ドメイン及び $C\epsilon$ 4ドメインから構成され、IgG、IgA及びIgDに見られるようなヒンジ領域を有しない。

【0024】さらに、IgGを例に挙げるならば、IgGをババインで処理すると、2つの重鎖を連結させているヒンジ領域中に存在するジスルフィド結合のややN末端側で切断されて、 V_H 及び C_H 1からなる重鎖断片と1つの軽鎖がジスルフィド結合で連結した2つの相同なFab、並びにヒンジ領域、 C_H 2ドメイン及び C_H 3ドメインからなる2つの相同な重鎖断片がジスルフィド結合で連結した1つのFcを生ずる（以上、「免疫学イラストレイテッド」、原書第2版、第65～75頁、1992年、南江堂発行、及び「最新医科学の焦点「免疫系の認識機構」」、第4～7頁、1991年、南江堂発行など参照）。

【0025】即ち、本発明における「免疫グロブリンの重鎖の一部」とは、上述のような構造的特徴を有する免疫グロブリンの重鎖の一部を意味し、好ましくは、重鎖の定常領域またはその一部であり、特に好ましくはC1ドメインを欠く定常領域またはFc領域である。具体的には、IgG、IgAまたはIgDの場合には、各々のヒンジ領域、C2ドメイン及びC3ドメインからなる領域が挙げられ、IgMまたはIgEの場合には、各々のC2ドメイン、C3ドメイン及びC4ドメインからなる領域が挙げられる。とりわけ好ましい例としては、ヒト由来のIgG1のFc領域を挙げることができる。

【0026】本発明の「融合ポリペプチド」とは、前記の定義されるとおりの「哺乳動物の酸化LDL受容体の細胞外領域」と「哺乳動物の免疫グロブリン(Ig)の

重鎖の一部」との融合ポリペプチドである。好ましくは該酸化LDL受容体の細胞外領域とヒト免疫グロブリンの重鎖の定常領域またはその一部との融合ポリペプチドであり、さらに好ましくは該酸化LDL受容体の細胞外領域とヒトIgGの重鎖の定常領域の一部との融合ポリペプチドであり、特に好ましくは該酸化LDL受容体の細胞外領域とヒトIgGの重鎖のヒンジ領域、CH2ドメイン及びCH3ドメインからなる領域(Fc)との融合ポリペプチドである。

【0027】IgGとしては、IgG1が好ましい。該酸化LDL受容体としては、ヒトまたはウシの酸化LDL受容体为好ましく、特に好ましくは配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有するヒト酸化LDL受容体または配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有するウシ酸化LDL受容体である。ウシ酸化LDL受容体に関する本発明の融合ポリペプチド具体的態様としては、例えば、配列番号3に記載されるアミノ酸配列を有する融合ポリペプチドが挙げられる。また、配列番号3に記載の融合ポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号4または配列番号10を挙げることができる。本発明の融合ポリペプチドまたは細胞外領域ポリペプチドは、後述するような遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

【0028】本発明の「DNA」は、前述の本発明の融合ポリペプチドをコードするDNAであって、本発明の融合ポリペプチドをコードし得るいかなる塩基配列をも包含する。好ましくは、ヒトまたはウシの酸化LDL受容体の細胞外領域とヒトの免疫グロブリンの重鎖の定常領域またはその一部とからなる融合ポリペプチドをコードするDNAであり、さらに好ましくは、ヒトまたはウシの酸化LDL受容体の細胞外領域とヒトのIgG（特にIgG1）の定常領域の一部（特に、 C_H 2ドメイン及び C_H 3ドメインからなる領域(Fc)）とからなる融合ポリペプチドをコードするDNAである。前記においてヒト酸化LDL受容体の好適例としては、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられ、ウシ酸化LDL受容体としては配列番号2に記載のポリペプチドが挙げられる。

【0029】ウシ酸化LDL受容体に関する本発明の融合ポリペプチドをコードするDNAの具体的な態様としては、例えば、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有する融合ポリペプチドをコードするDNAが挙げられ、例えば、配列番号4または配列番号10に記載の塩基配列を有するDNAが挙げられる。本発明における融合ポリペプチドの一部である酸化LDL受容体の細胞外領域をコードするDNAとしては、cDNA及びゲノミックDNAのいずれをも用いることができる。

【0030】本発明における融合ポリペプチドの一部で

ある免疫グロブリンの重鎖の一部をコードするDNAとしては、cDNAであっても良いし、また各エクソン（例えば、C_H1ドメイン、ヒンジ領域、C_H2ドメイン、C_H3ドメイン、C_H4ドメインなどをコードするDNA）の間にイントロンを含むようなゲノミックDNAであっても良い。本発明においては、同一のアミノ酸をコードするコドンであればどのようなコドンから構成されるDNAを含む。また、本発明のDNAは、いかなる方法で得られるものであってもよい。例えばmRNAから調製される相補DNA（cDNA）、ゲノムDNAから調製されるDNA、化学合成によって得られるDNA、RNAまたはDNAを鋳型としてPCR法で増幅させて得られるDNAおよびこれらの方法を適当に組み合わせて構築されるDNAをも全て包含するものである。

【0031】本発明における酸化LDL受容体及び免疫グロブリンの重鎖をコードするDNAは、常法に従って、該酸化LDL受容体及び免疫グロブリンの重鎖をコードするmRNAからcDNAをクローン化する方法、ゲノムDNAを単離してスプライシング処理する方法、該cDNA配列若しくはmRNA配列を鋳型としてPCRにより調製する方法、または化学合成する方法等により取得することができる。本発明の融合ポリペプチドをコードするDNAは、そのようにして調製した該酸化LDL受容体及び免疫グロブリンの重鎖をコードする各々のDNAを適切な制限酵素による切断（消化）し、得られたDNA断片を、必要に応じてリンカーDNAあるいはタグ（Tag）と共に、適切なDNAポリメラーゼ等を用いて連結することにより調製することができる。

【0032】該酸化LDL受容体または免疫グロブリンの重鎖（以下、目的蛋白という）をコードするcDNAをmRNAからクローン化する方法としては、以下の方法が例示される。まず、目的蛋白を発現・産生する組織あるいは細胞から目的蛋白をコードするmRNAを調製する。mRNAの調製は、例えばグアニジンチオシアネート法（チャークウィン（Chirgwin）ら、バイオケミストリー（Biochemistry）、第18巻、第5294頁、1979年）、熱フェノール法もしくはAGPC法等の公知の方法を用いて調製した全RNAをオリゴ（dT）セルロースやポリウーセファロース等によるアフィニティークロマトグラフィーにかけることによって行うことができる。

【0033】次いで得られたmRNAを鋳型として、例えば逆転写酵素を用いる等の公知の方法、例えばオカヤマらの方法（モレキュラーセルバイオロジー（Mol. Cell Biol.）、第2巻、第161頁、1982年及び同誌第3巻、第280頁、1983年）やホフマン（Hoffman）らの方法（ジーン（Gene）、第25巻、第263頁、1983年）等によりcDNA鎖を合成し、cDNAの二本鎖cDNAへの変換を行う。このcDNAをプラスミドベクター、ファージベクターまたはコスミドベ

クターに組み込み、大腸菌を形質転換して、あるいはインビトロパッケージング後、大腸菌に形質移入（トランスフェクト）することによりcDNAライブラリーを作製する。

【0034】ここで用いられるプラスミドベクターとしては、宿主内で複製保持されるものであれば特に制限されず、また用いられるファージベクターとしても宿主内で増殖できるものであれば良い。常法的に用いられるクローニング用ベクターとしてpUC19、λgt10、λgt11等が例示される。ただし、後述の免疫学的スクリーニングに供する場合は、宿主内で目的蛋白をコードする遺伝子を発現させるプロモーターを有したベクターであることが好ましい。

【0035】プラスミドにcDNAを組み込む方法としては、例えばマニアティス（Maniatis）らの方法（モレキュラークローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル（Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition）、コールドスプリングハーバーラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）、第1.53頁、1989年）に記載の方法などが挙げられる。また、ファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、ヒュン（Hyunh）らの方法（DNAクローニング、プラクティカルアプローチ（DNA Cloning, a practical approach）、第1巻、第49頁、1985年）などが挙げられる。簡便には、市販のクローニングキット（例えば、宝酒造製等）を用いることもできる。このようにして得られる組換えプラスミドやファージベクターは、原核細胞（例えば、E. coli: HB101、DH5α、DH10BまたはMC1061/P3等）等の適当な宿主に導入する。

【0036】プラスミドを宿主に導入する方法としては、（モレキュラークローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル（Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition）、コールドスプリングハーバーラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）、第1.74頁、1989年）に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム／塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、ファージベクターを宿主に導入する方法としてはファージDNAをインビトロパッケージングした後、増殖させた宿主に導入する方法等が例示される。インビトロパッケージングは、市販のインビトロパッケージングキット（例えば、ストラタジーン製、アマシャム製等）を用いることによって簡便に行うことができる。上記の方法によって作製されたcDNAライブラリーから、目的蛋白をコードするcDNAを単離する方法は、一般的なcDNAスクリーニング法を組み合わせるによって行うことができる。

【0037】例えば、別個に目的蛋白のアミノ酸配列に対応すると考えられるオリゴヌクレオチドを化学合成したのち、これを³²Pでラベルしてプローブとなし、公知

のコロニーハイブリダイゼーション法（クランシュタイン（Crunstein）ら、プロシーディングスオブナショナルアカデミーオブサイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、第72巻、第3961頁、1975年）またはブランクハイブリダイゼーション法（Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 第2.108頁、1989年）により、目的のcDNAを含有するクローンをスクリーニングする方法、PCRプライマーを作製し目的蛋白の特定領域をPCR法により増幅し、該領域をコードするDNA断片を有するクローンを選択する方法等が挙げられる。

【0038】また、cDNAを発現しうるベクター（例えば、 λ gt11等のファージベクター）を用いて作製したcDNAライブラリーを用いる場合には、目的蛋白に反応性を有する抗体を用いる抗原抗体反応を利用して、目的のクローンを選択することができる。大量にクローンを処理する場合には、PCR法を利用したスクリーニング法を用いることが好ましい。この様にして得られたDNAの塩基配列はマキサム・ギルバート法（マキサム（Maxam）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第74巻、第560頁、1977年）あるいはファージM13を用いたジデオキシヌクレオチド合成鎖停止の方法（サンガー（Sanger）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第74巻、第5463～5467頁、1977年）によって決定することができる。目的蛋白をコードする遺伝子は、その全部または一部を上記のようにして得られるクローンから制限酵素等により切り出すことにより取得できる。

【0039】また、前述のような目的蛋白を発現する細胞に由来するゲノムDNAから目的蛋白をコードするDNAを単離することによる調製方法としては、例えば以下の方法が例示される。該細胞を好ましくはSDSまたはプロテナーゼK等を用いて溶解し、フェノールによる抽出を反復してDNAの脱蛋白質を行う。DNAを好ましくはリボヌクレアーゼにより消化する。得られるDNAを適当な制限酵素により部分消化し、得られるDNA断片を適当なファージまたはコスミドで増幅しライブラリーを作成する。そして目的の配列を有するクローンを、例えば放射性標識されたDNAプローブを用いる方法等により検出し、該クローンから目的蛋白をコードする遺伝子の全部または一部を制限酵素等により切り出し取得する。

【0040】ヒト由来蛋白をコードするcDNAを取得する場合には、さらにヒトゲノムDNA（染色体DNA）が導入されたコスミドライブラリーを作製（「ラボマニュアルヒトゲノムマッピング」、堀雅明及び中村祐輔 編、丸善出版）し、該コスミドライブラリーをスクリーニングすることにより、目的蛋白のコーディング領域のDNAを含む陽性クローンを得、該陽性クローンか

ら切り出したコーディングDNAをプローブとして用い、前述のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより調製することもできる。

【0041】目的蛋白をコードするDNAのPCRによる調製は、該目的蛋白の既知のmRNAまたはcDNA等を鋳型として常法により調製することができる（「遺伝子増幅PCR法・基礎と新しい展開」、共立出版株式会社発行、1992年など）。また、化学的合成による目的蛋白をコードするDNAの製造は、目的蛋白の塩基配列をもとにして、常法に従って行うことができる。

【0042】本発明の融合ポリペプチドは、上述に例示した方法を用いて調製した酸化LDL受容体及び免疫グロブリンの重鎖をコードするDNA（cDNAあるいはイントロンを含むゲノミックDNA）を、各々適切な制限酵素で切断することにより、該酸化LDL受容体の細胞外領域及び免疫グロブリンの重鎖の一部をコードするDNA断片を得、それらの末端に適切な制限酵素部位を付加するか、または必要に応じてリンカーDNAあるいはタグ（Tag）を用い、適切なDNAポリメラーゼ等を用いて連結させ融合DNAとし、慣用される遺伝子組換え技術を用いて、常法により組換え蛋白として調製することができる。具体的には下記の例示されるとおりである。

【0043】酸化LDL受容体の細胞外領域をコードするDNA（好ましくはcDNA）は、所望の酸化LDL受容体の細胞外領域と細胞膜貫通領域との境界の周辺の塩基配列を適当な部位で切断することが可能な制限酵素で切断することにより調製することができる。例えば、ヒト及びウシの酸化LDL受容体LOX-1（配列番号1及び配列番号2）をコードするcDNAの場合には、BamHIを用いることができる。

【0044】免疫グロブリンの重鎖の一部をコードするDNA（好ましくはcDNA）は、所望の部位で切断することが可能な制限酵素で切断することにより調製することができる。例えば、ヒトIgG1のFc領域をコードするcDNAを調製する場合には、BamHIを用いることができる。上述のようにして得られた酸化LDLの細胞外領域をコードするDNAと免疫グロブリンの重鎖の一部をコードするDNAとの連結は、例えば、末端に適切な制限酵素部位を付加するか、または必要に応じてリンカーDNAやタグ（Tag）と共に、市販のDNAライゲーションキットを用いて行うことができる。

【0045】このようにして調製した融合DNAを、下記に詳述するようなベクターに挿入して発現ベクターを作成し、該発現ベクターで後述するような宿主細胞を形質転換して形質転換体を得る。該形質転換体を培養することにより、培養上清中に該融合ポリペプチドを産生させる。培養上清中の該融合ポリペプチドは、プロテインAカラムクロマトグラフィー等を用いて容易に精製することができる。本発明は、また本発明の融合ポリペプチ

ドをコードするDNAを含有する発現ベクターに関する。本発明の発現ベクターとしては、原核細胞及び／または真核細胞の各種の宿主内で複製保持または自己増殖できるものであれば特に制限されず、プラスミドベクターおよびファージベクターが包含される (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, エルスビュー社、ニューヨーク、1985年)。

【0046】当該発現ベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター (プラスミドDNAおよびバクテリアファージDNA) に本発明の融合ポリペプチドをコードするDNAを常法により連結することによって調製することができる。用いられる組換え用ベクターとして具体的には、大腸菌由来のプラスミドとして例えばpBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pUC19など、酵母由来プラスミドとして例えばpSH19、pSH15など、枯草菌由来プラスミドとして例えばpUB110、pTP5、pC194などが例示される。また、ファージとしては、λファージなどのバクテリオファージが、さらにレトロウイルス、ワクシニアウイルス、核多角体ウイルスなどの動物や昆虫のウイルス (pVL1393、インビトロゲン製) が例示される。

【0047】本発明の融合ポリペプチドをコードするDNAを発現させ該融合ポリペプチドを生産させる目的においては、プラスミドベクターが有用である。プラスミドベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞中で該融合ポリペプチドをコードする遺伝子を発現し、これらのポリペプチドを生産する機能を有するものであれば特に制限されない。例えば、pMALC2、pEF-BOS (ヌクレイックアシッドリサーチ (Nucleic Acid Research)、第18巻、第5322頁、1990年等) あるいはpME18S (実験医学別冊「遺伝子工学ハンドブック」、1992年等) 等を挙げることができる。

【0048】宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくともプロモーター・オペレーター領域、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位から構成される。宿主として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、発現ベクターは少なくともプロモーター、開始コドン、本発明の融合ポリペプチドをコードするDNA、終止コドンを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、本発明の融合ポリペプチドをコードする遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、選択マーカー領域または複製可能単位などを含んでもよい。また、目的に応じて通常用いられる遺伝子増幅遺伝子 (マーカー) を含んでもよい。

【0049】細菌中で本発明の融合ポリペプチドを発現させるためのプロモーター・オペレーター領域は、プロ

モーター、オペレーターおよび Shine-Dalgarno (SD) 配列 (例えば、AAGGなど) を含むものである。例えば宿主がエシェリキア属菌の場合、好適にはTrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーターなどを含むものが例示される。

【0050】酵母中で本発明の融合ポリペプチドを発現させるためのプロモーターとしては、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターが挙げられ、宿主がバチルス属菌の場合は、SL01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが挙げられる。また、宿主が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。好ましくは、SV-40、レトロウイルスである。しかし、特にこれらに限定されるものではない。また、発現にはエンハンサーの利用も効果的な方法である。好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン (ATG) が例示される。終止コドンとしては、常用の終止コドン (例えば、TAG、TGAなど) が例示される。

【0051】ターミネーター領域としては、通常用いられる天然または合成のターミネーターを用いることができる。複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNAを言い、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド (天然のプラスミドから調製されたDNAフラグメント) および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E. coli ではプラスミドpBR322、もしくはその人工的修飾物 (pBR322を適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント) が、酵母では酵母2μプラスミド、もしくは酵母染色体DNAが、また哺乳動物細胞ではプラスミドpRSVneo ATCC 37198、プラスミドpSV2dhfr ATCC 37145、プラスミドpdBPV-MMTneo ATCC 37224、プラスミドpSV2neo ATCC 37149、プラスミドpSV2bsr等があげられる。

【0052】エンハンサー配列、ポリアデニレーション部位およびスプライシング接合部位については、例えばそれぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシン等の抗生物質耐性遺伝子等が例示される。遺伝子増幅遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、グルタミン酸合成酵素遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、オルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子、ヒグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、アスパラゲートトランスカルバミラーゼ遺伝子等を例示することができる。

【0053】本発明の発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、本発明のタンパクをコードするDNA、終止コドンおよびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他のリストリクシオンサイトなど）を用いることができる。本発明の形質転換細胞は、上述の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより調製することができる。

【0054】本発明で用いられる宿主細胞としては、前記の発現ベクターに適合し、形質転換されうるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞あるいは人工的に樹立された組換え細胞など種々の細胞（例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞または昆虫細胞など）が例示される。好ましくは大腸菌あるいは動物細胞であり、具体的には大腸菌（DH5 α 、DH10B、TB1、HB101、XL-2Blue等）、マウス由来細胞（COP、L、C127、Sp2/0、NS-1またはNIH3T3等）、ラット由来細胞、ハムスター由来細胞（BHKおよびCHO等）、サル由来細胞（COS1、COS3、COS7、CV1およびVelo等）およびヒト由来細胞（HeLa、2倍体線維芽細胞に由来する細胞、ミエローマ細胞およびNamalwa等）などが例示される。

【0055】発現ベクターの宿主細胞への導入（形質転換（形質移入））は従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、細菌（E.coli、Bacillus subtilis等）の場合は、例えばCohenらの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第69巻、第2110頁、1972年）、プロトプラスト法（Mol. Gen. Genet.、第168巻、第111頁、1979年）やコンピテント法（ジャーナルオブモレキュラーバイオロジー（J. Mol. Biol.）、第56巻、第209頁、1971年）によって、Saccharomyces cerevisiaeの場合は、例えばハイネン（Hinnen）らの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第75巻、第1927頁、1978年）やリチウム法（J. Bacteriol.、第153巻、第163頁、1983年）によって、動物細胞の場合は、例えばグラハム（Graham）の方法（バイロロジー（Virology）、第52巻、第456頁、1973年）によって、昆虫細胞の場合は、例えばサマーズ（Summers）らの方法（Mol. Cell. Biol.、第3巻、第2156～第2165頁、1983年）によってそれぞれ形質転換することができる。本発明の融合ポリペプチドは、上記の如く調製される発現ベクターを含む形質転換細胞（以下、形質移入体を含む意味で使用する。）を栄養培地で培養することによって製造することができる。

【0056】栄養培地は、宿主細胞（形質転換体）の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素（例えば、無機塩（例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等）など）を含んでいてもよい。

【0057】培養は当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地のpHおよび培養時間は、本発明の融合ポリペプチドが大量に生産されるように適宜選択される。なお、下記に宿主細胞に応じて用いられる具体的な培地および培養条件を例示するが、何らこれらに限定されるものではない。宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pHが5～8である培地である。

【0058】宿主がE. coliの場合、好ましい培地としてLB培地、M9培地（ミラー（Miller）ら、Exp. Mol. Genet. Cold Spring Harbor Laboratory、第431頁、1972年）、YT培地などが例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌しながら、通常14～43℃、約3～24時間行うことができる。宿主がBacillus属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常30～40℃、約16～96時間行うことができる。宿主が酵母である場合、培地として、例えばBurkholder最小培（ボスチアン（Bostian）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第77巻、第4505頁、1980年）が挙げられ、pHは5～8であることが望ましい。培養は通常約20～35℃で約14～144時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0059】宿主が動物細胞の場合、培地として例えば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地（サイエンス（Science）、第122巻、第501頁、1952年）、DMEM培地（バイロロジー（Virology）、第8巻、第396頁、1959年）、RPMI 1640培地（J. Am. Med. Assoc.、第199巻、第519頁、1967年）、199培地（proc. Soc. Exp. Biol. Med.、第73巻、第1頁、1950年）、HamF12培地等を用いることができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は通常約30～40℃で約15～72時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。宿主が昆虫細胞の場合、例えば胎児牛血清を含むGrace's培地（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第82巻、第8404頁、1985年）等が挙げられ、そのp

Hは約5～8であるのが好ましい。培養は通常約20～40℃で15～100時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0060】本発明の融合ポリペプチドは、上述のような形質転換細胞（特に動物細胞または大腸菌）を培養することにより、培養上清中に分泌させることにより製造することができる。すなわち、得られた培養物を濾過または遠心分離等の方法で培養上清（上清）を得、該培養上清から天然または合成蛋白質を精製並びに単離するために一般に用いられる常法に従って該本発明の融合ポリペプチドを精製、単離する。単離、精製方法としては、例えば蛋白質Aアフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

【0061】一方、本発明の融合ポリペプチドが培養された形質転換体のペリプラズムまたは細胞質内に存在する場合は、培養物を濾過または遠心分離などの常法に付して菌体あるいは細胞を集め、適当な緩衝液に懸濁し、例えば超音波やリゾチーム及び凍結融解などの方法で細胞等の細胞壁および／または細胞膜を破壊した後、遠心分離やろ過などの方法で本発明の融合ポリペプチドを含む膜画分を得る。該膜画分をトライトン-X100等の界面活性剤を用いて可溶化して粗溶液を得る。そして、当該粗溶液を先に例示したような常法を用いることにより、単離、精製することができる。

【0062】本願における方法の発明において用いられる「抗体」とは、ポリクローナル抗体（抗血清）またはモノクローナル抗体を意味する。また、本発明においては、後述するようなFab該モノクローナル抗体の一部も包含される。具体的には、哺乳動物（ヒト、ウシ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット及びウサギなど、特に好ましくはヒト）の酸化LDL等の種々の変性LDL（酸化LDL、アセチルLDL、サクシニルLDL、マロンジアルデヒドLDLなど）またはアポリポrotein Bに反応性を有する抗体である。好ましくは、少なくとも該哺乳動物（特に好ましくはヒト）のアポリポrotein Bに反応性を有する抗体である。

【0063】即ち、血中等の体液中においては、LDL（低密度リポ蛋白）は、アポリポrotein Bと結合していることから、当該発明においては、酸化LDL等の種々の変性LDLに反応性を有する抗体、またはアポリポrotein Bに反応性を有する抗体のいずれをも用いることができる。該抗体は、該酸化LDL等の種々の変

性LDLまたはアポリポrotein B（組換蛋白を含む）に反応性を有する限りどのような抗体をも使用できる。即ち、該酸化LDL等の種々の変性LDLまたはアポリポrotein B（組換蛋白を含む）を、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ヤギあるいはヒツジ等の哺乳動物に免疫して得られる天然型哺乳動物抗体、並びに遺伝子組換技術を用いて製造され得るキメラ抗体（実験医学（臨時増刊号）、第1・6巻、第10号、1988年、特公平3-73280号公報、及びMolecular Medicine, Vol.32, No.6, p.638-644, 1995年等）及びヒト型抗体（CDR-grafted抗体、特表平4-506458号公報、特開昭62-296890号公報、及びMolecular Medicine, Vol.32, No.6, p.638-644, 1995年等）のいずれも用いることができる。

【0064】またモノクローナル抗体の場合には、IgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、IgM、IgA（IgA1、IgA2）、IgDあるいはIgE等のいずれのクラスあるいはサブクラスに属するモノクローナル抗体をも包含する。好ましくは、IgGまたはIgMである。本発明で言うポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体は、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、抗原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、哺乳動物、好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ヤギあるいはヒツジに免疫する。ポリクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。またモノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞（ミエローマ細胞）から細胞融合によりハイブリドマを調製し、該ハイブリドマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。

【0065】モノクローナル抗体は、具体的には下記のようにして製造することができる。即ち、前述のような酸化LDL等の種々の変性LDLまたはアポリポrotein B（組換蛋白を含む）を免疫原として、該免疫原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ヤギあるいはヒツジの皮下内、筋肉内、静脈内、フッドパッド内あるいは腹腔内に1乃至数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1乃至14日毎に1乃至4回免疫を行って、必要に応じて、最終免疫より約1乃至5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。

【0066】モノクローナル抗体を分泌するハイブリド

ーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法（ネイチャー(Nature)、第256巻、第495～第497頁、1975年）及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製される。

【0067】細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマP3/X63-Ag8.653(653)、P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1)、P3/X63-Ag8.U1(P3U1)、SP2/O-Ag14(Sp2/O、Sp2)、PA1、F0あるいはBW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag.2.3.、ヒト由来ミエローマU-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、D1R11あるいはCEM-T15を使用することができる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドマクローンのスクリーニングは、ハイブリドマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前述の哺乳動物免疫感作で用いた免疫抗原に対する反応性を、例えばRIAやELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行うことができる。

【0068】ハイブリドマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドマをインビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行い、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特長、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

【0069】基本培地としては、例えば、Ham' F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地等の低カルシウム培地及びMCDB104培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI1640培地、ASF104培地あるいはRD培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／または種々無機あるいは有機物質等を含むことができる。モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロリン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー(DEAEまたはDE52等)、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニテ

ィカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

【0070】前述の本発明における「モノクローナル抗体の一部」とは、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv (variable fragment of antibody)、 sFv 、 $dsFv$ (disulphide stabilised Fv) あるいは dAb (single domain antibody) 等を意味する（エキスパート・オピニオン・オン・テラビューティック・パテンツ(Exp. Opin. Ther. Patents)、第6巻、第5号、第441～456頁、1996年）。ここで、「 $F(ab')_2$ 」及び「 Fab' 」とは、イムノグロブリン(モノクローナル抗体)を、蛋白分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されて V_L (L鎖可変領域)と C_L (L鎖定常領域)からなるL鎖、及び V_H (H鎖可変領域)と $C_H\gamma1$ (H鎖定常領域中の $\gamma1$ 領域)とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々 Fab' という。またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つの Fab' がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントを $F(ab')_2$ という。

【0071】本発明における「不溶性担体」とは、本発明の融合ポリペプチドを物理学的吸着あるいは化学的結合等によって担持させるための支持体を意味する。例えば、(1)ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂あるいはナイロン樹脂等からなるプラスチックや、ガラス等に代表されるような水に不溶性の物質からなるプレート、試験管若しくはチューブ等の内容積を有するもの、ビーズ、ボール、フィルター、あるいはメンブレン等、並びに(2)セルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等のようなアフィニティークロマトグラフィーに用いられる不溶性担体を挙げることができる。

【0072】「融合ポリペプチド固定化不溶性担体」とは、前記のような不溶性担体上に、本発明の融合ポリペプチドが、物理的吸着あるいは化学的結合等によって担持された状態にある不溶性担体を意味する。これらの融合ポリペプチド固定化不溶性担体は、試料(例えば、血清や血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等)中に含まれる酸化LDL等の変性LDLを検出、定量、分離または精製するために用いることができる。該検出または定量の目的においては、前記(1)に挙げた不溶

性担体を用いることができ、とりわけ定量に用いる不溶性担体としては、操作の簡便性及び多数検体の同時処理の観点を考慮すると、例えば96穴マイクロタイタープレートあるいは48穴マイクロタイタープレート等の多数のウェル(Well、穴)を有するマルチウェルプラスチックプレートを用いるのが好ましい。また、該分離または精製の目的においては、前記(1)に挙げたフィルター若しくはメンブレンまたは前記(2)に挙げた不溶性担体を用いることができる。

【0073】本発明における「単独または他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質」とは、それらを、前述のような抗体あるいは酸化LDLの標準物質に物理化学的結合等により結合させることによりそれらの存在を検出可能にするために用いられる物質を意味する。

【0074】具体的には、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジンあるいは放射性同位体等であり、さらに具体的には、ペルオキシダーゼ(例えば、horseradish peroxidase)、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 若しくは ^{131}I 等の放射性同位体、ビオチン、アビジン、または化学発光物質が挙げられる。ここで、放射性同位体及び蛍光物質は、単独で検出可能なシグナルをもたらすことができる。一方、酵素、化学発光物質、ビオチン及びアビジンは、単独では検出可能なシグナルをもたらすことができないため、さらに1種以上の他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらす。例えば、酵素の場合には少なくとも基質が必要であり、酵素活性を測定する方法(比色法、蛍光法、生物発光法あるいは化学発光法等)に依存して種々の基質が用いられる。例えば、ペルオキシダーゼの場合には、基質として過酸化水素を用いる。また、ビオチンの場合には少なくともアビジンあるいは酵素修飾アビジンを反応させるのが一般的であるが、この限りではない。必要に応じてさらに該基質に依存する種々の発色物質が用いられる。

【0075】本発明においては、上記のいずれの標識物質をも使用可能であるが、検出感度あるいは定量感度の高さ及び操作の利便性の点を考慮すると、ペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンで標識するのが好ましい。ここで「酸化LDLの標準物質」とは、試料中に含まれる濃度(含量)未知の酸化LDL等の変性LDLと対照的に、あらかじめ単離されている酸化LDL等の変

性LDLを意味し、アッセイの目的に応じて自由にその濃度をコントロールすることができる標品(スタンダード)を意味する。該標準物質は、例えば、検量線の作成に用いることができる。

【0076】本発明における「イムノアッセイ」とは、受容体とそのリガンドとの反応、並びに抗原と抗体との反応の原理に基づき、試料(例えば、血清あるいは血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等)中に含まれる目的物質の検出あるいは定量を行う方法を意味する。本発明においては、該受容体が酸化LDL受容体であり、該リガンドが該酸化LDL受容体のリガンド(酸化LDL等の変性LDL)である。また、本発明においては、該抗原が酸化LDL受容体のリガンド(酸化LDL等の変性LDL)であり、該抗体が該酸化LDL受容体のリガンド(酸化LDL等の変性LDL)に反応性を有する抗体または該酸化LDL等の変性LDLと結合する性質を有するアポリポプロテインBに反応性を有する抗体である。本発明においては、そのような受容体とリガンドの反応、並びに抗原抗体反応を実施できる方法であれば、これまでに知られているどのようなイムノアッセイをも使用することができる。

【0077】具体的には、酵素免疫測定法(第3版、石川榮治ら編集、医学書院発行、1987年)に記載されているような種々方法の原理を応用することができる。即ち、該種々方法においては、検出あるいは定量しようとする試料中の目的物質の捕捉(キャプチャーリング、トラッピング)のために、該目的物質に対する1つ以上の抗体を用いるが、本発明においては、該抗体の1つを本発明の融合ポリペプチドに置き換えることにより同様にアッセイを実施することができる。

【0078】応用できる原理としては、例えば、一抗体固相法、二抗体液相法、二抗体固相法、サンドイッチ法、及び特公平2-39747号公報に記載されているようなワンボット法を好適な例として挙げることができる。また、抗原抗体反応を利用したアッセイとしては、EMIT法(Enzyme multiplied immunoassay technique)、エンザイムチャネリングアッセイ(Enzyme channeling immunoassay)、酵素活性修飾物質標識イムノアッセイ(Enzyme modulator mediated enzyme immunoassay、EMMIA)、酵素阻害物質標識イムノアッセイ(Enzyme inhibitor immunoassay)、イムノエンザイムメトリックアッセイ(Immunoenzymometric assay)、酵素活性増強イムノアッセイ(Enzyme enhanced immunoassay)及びプロキシマルリンケージイムノアッセイ(Proximal linkage immunoassay)等も知られている。

【0079】本発明においては、このようなイムノアッセイのいずれかの原理を、目的に応じて適宜選択して用いることができるが、操作上の簡便性及び/または経済的な利便性、とりわけ臨床上での汎用性の点を考慮すると、サンドイッチ法、ワンボット法、または一抗体固相

法の原理を用いるのが好ましく、より好ましくは、サンドイッチ法またはワンボット法の原理である。特に好ましくは、96穴マイクロプレートに代表されるような多数のウェルを有するマルチウェルマイクロタイタープレートに本発明のポリペプチドを固定化した融合ポリペプチド固定化不溶性担体と、酵素あるいはビオチンにより標識された標識抗体とを用いるサンドイッチ法、あるいは本発明の融合ポリペプチドをその表面上に固定化したビーズと、ペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンにより標識された標識抗体とを用いるワンボット法である。

【0080】本発明の好適な具体的態様の一例を挙げるならば、ヒトまたはウシの酸化LDL受容体（好ましくは、LOX-1）の細胞外領域とヒトの免疫グロブリン（好ましくはIgG、特に好ましくはIgG1）の重鎖の定常領域の一部（好ましくはFc）からなる融合ポリペプチドをマルチウェルマイクロタイタープレートまたはビーズに固定化した融合ポリペプチド固定化不溶性担体と、酸化LDL等の変性LDLまたはアポリボプロテインBに反応性を有する抗体を酵素またはビオチンで標識した標識抗体とを用いるサンドイッチ法またはワンボット法である。

【0081】以下に、サンドイッチ法、ワンボット法、及び一抗体固相法の原理を用いた本発明の方法を例示する。サンドイッチ法の原理を用いた本発明の方法は、前述の本発明の（22）に記載した方法、即ち、少なくとも下記（a）及び（b）の工程を含むイムノアッセイ法である。

（a）本発明の融合ポリペプチド固定化不溶性担体に、試料を反応せしめる工程。

（b）該融合ポリペプチド固定化不溶性担体と該試料中に含まれる酸化LDLとの結合により形成される複合体に、単独または他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された抗体であって、酸化LDLまたはアポリボプロテインBに反応性を有する抗体を反応せしめる工程。

【0082】本発明に即して、本方法を、不溶性担体としてマルチウェルマイクロタイタープレートを用い、また標識物質としてペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンを用いた方法について具体的に説明すると、例えば下記のような工程により構成されるが、該具体例のみに限定されるものではない。

（工程1）本発明の融合ポリペプチドをマルチウェルマイクロタイタープレートに固定化し、融合ポリペプチド固定化マイクロプレートを作製する工程；

（工程2）該マイクロプレートにヒト血漿等の試料を加え、試料を、該マイクロプレート上に固定化されている融合ポリペプチドと反応させる工程；

（工程3）該マイクロプレートを洗浄し、未反応の試料を該マイクロプレートから取り除く工程；

（工程4）酸化LDLまたはアポリボプロテインBに反応性を有する抗体を、ペルオキシダーゼ等の酵素またはビオチンにより標識し、標識抗体を作製する工程；

（工程5）工程3で洗浄されたマイクロプレートに、該標識抗体を加え、該マイクロプレート上に固定化された融合ポリペプチドと試料中に含まれる酸化LDL等の変性LDLが反応して形成される複合体に該標識抗体を反応させる工程；

（工程6）マイクロプレートを洗浄し、未反応の標識抗体を該マイクロプレートから取り除く工程；

（工程7）工程6で洗浄されたマイクロプレートに、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程5でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程5でビオチンで標識した標識抗体を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる工程；

（工程8）工程7で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

（工程9）マイクロプレートに反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

（工程10）比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0083】ワンボット法の原理を用いた本発明の方法は、前述の本発明の（22）乃至（24）に記載した方法である。即ち、第1は、少なくとも下記（a）及び（b）の工程を含むイムノアッセイ法である。

（a）本発明の融合ポリペプチド固定化不溶性担体に、試料を反応せしめる工程。

（b）該融合ポリペプチド固定化不溶性担体と該試料中に含まれる酸化LDLとの結合により形成される複合体に、単独または他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された抗体であって、酸化LDLまたはアポリボプロテインBに反応性を有する抗体を反応せしめる工程。

【0084】第2は、少なくとも下記（a）及び（b）の工程を含むイムノアッセイ法である。

（a）単独または他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された抗体であって、酸化LDLまたはアポリボプロテインBに反応性を有する抗体と、試料を反応せしめる工程。

（b）該抗体と該試料中に含まれる酸化LDLとの結合により形成される複合体と、本発明の融合ポリペプチド固定化不溶性担体を反応せしめる工程。

【0085】第3は、少なくとも下記（a）の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 本発明の融合ポリペプチド固定化不溶性担体、単独または他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された抗体であって、酸化LDLまたはアポリボプロテインBに反応性を有する抗体、及び試料を含む混合物を反応せしめる工程。本発明に即して、上記第1乃至第3の方法を、不溶性担体としてビーズを用い、また標識物質としてペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンを用いた方法について具体的に説明すると、各々例えば下記のような工程により構成されるが、該具体例のみに限定されるものではない。

【0086】第1の方法は、下記のような工程から構成される。

(工程1) 本発明の融合ポリペプチドをビーズに固定化し、融合ポリペプチド固定化ビーズを作製する工程；

(工程2) 試験管、プレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器に緩衝液とともに該ビーズとヒト血漿等の試料を加え、該ビーズ上に固定化された融合ポリペプチドと試料とを反応させる工程；

(工程3) 容器中の内溶液を除去し、ビーズを洗浄する工程；

(工程4) 酸化LDLまたはアポリボプロテインBに反応性を有する抗体を、ペルオキシダーゼ等の酵素またはビオチンにより標識し、標識抗体を作製する工程；

(工程5) 工程3で洗浄されたビーズを含有する容器に、該標識抗体を加え、該ビーズ上に固定化された融合ポリペプチドと試料中に含まれる酸化LDL等の変性LDLとが反応して形成される複合体に、該標識抗体を反応させる工程；

(工程6) 容器中の内溶液を除去し、ビーズを洗浄することにより、未反応の標識抗体を取り除く工程；

(工程7) 工程6で洗浄されたビーズを含む容器に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程5でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程5でビオチンで標識した標識抗体を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる工程；

(工程8) 工程7で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程9) 工程7または工程8の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程10) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0087】第2の方法は、下記のような工程から構成される。

(工程1) 酸化LDLまたはアポリボプロテインBに反

応性を有する抗体を、ペルオキシダーゼ等の酵素またはビオチンにより標識し、標識抗体を作製する工程；

(工程2) 試験管、マイクロプレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器に、緩衝液と共に、該標識抗体とヒト血漿等の試料を加え、該標識抗体と試料とを反応させる工程；

(工程3) 本発明の融合ポリペプチドをビーズに固定化し、融合ポリペプチド固定化ビーズを作製する工程；

(工程4) 工程2の反応系に、該ビーズを加え、標識抗体と試料中に含まれる酸化LDL等の変性LDLが反応して形成される複合体と、該ビーズ上に固定化された融合ポリペプチドとを反応させる工程；

(工程5) 容器中の内溶液を除去し、該ビーズを洗浄することにより、未反応の標識抗体を取り除く工程；

(工程6) 工程5で洗浄されたビーズを含む容器に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程2でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程2でビオチンで標識した標識抗体を用いた場合）を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる工程；

(工程7) 工程6で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程8) 工程6または工程7の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程9) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0088】第3の方法は、下記のような工程から構成される。

(工程1) 本発明の融合ポリペプチドをビーズに固定化し、融合ポリペプチド固定化ビーズを作製する工程；

(工程2) 酸化LDLまたはアポリボプロテインBに反応性を有する抗体を、ペルオキシダーゼ等の酵素またはビオチンにより標識し、標識抗体を作製する工程；

(工程3) 試験管、プレートあるいはチューブ等のような内容積を有する容器に緩衝液とともに、工程1で作製された融合ポリペプチド固定化ビーズ、工程2で作製された標識抗体、及びヒト血漿等の試料を加え、該ビーズ上に固定化された融合ポリペプチド、標識抗体、及び試料を同時に反応させる工程；

(工程4) 容器中の内溶液を除去し、該ビーズを洗浄することにより、未反応の標識抗体を取り除く工程；

(工程5) 工程4で洗浄されたビーズを含む容器に、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質（但し、工程3でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識抗体を用いた場合）またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン（但し、工程3でビオチンで標

識した標識抗体を用いた場合)を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識抗体上の標識物質とを反応させる工程；

(工程6) 工程5で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程7) 工程5または工程6の反応系に反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程8) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

【0089】一抗体固相法の原理を用いた本発明の方法は、前述の本発明の(25)に記載した方法、即ち、少なくとも下記(a)の工程を含むイムノアッセイ法である。

(a) 本発明の融合ポリペプチド固定化不溶性担体に、試料、並びに単独または他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質で標識された酸化LDLの標準物質を反応せしめる工程。本発明に即して、本方法を、不溶性担体としてマルチウェルマイクロプレートを用い、また標識物質としてペルオキシダーゼ等の酵素あるいはビオチンを用いた方法について具体的に説明すると、各々例えば下記のような工程により構成されるが、該具体例のみに限定されるものではない。

【0090】(工程1) 本発明の融合ポリペプチドをマルチウェルマイクロタイタープレートに固定化し、融合ポリペプチド固定化マイクロプレートを作製する工程；

(工程2) 酸化LDL受容体のリガンドである酸化LDL等の変性LDLを、ペルオキシダーゼ等の酵素またはビオチンにより標識し、標識酸化LDL標準物質を作製する工程；

(工程3) 該マイクロプレートに、ヒト血漿等の試料及び該標識標準物質を加え、該試料と標識標準物質とを、該マイクロプレート上に固定化された融合ポリペプチドと競合的に反応させる工程；

(工程4) マイクロプレートを洗浄し、未反応の標識標準物質を、マイクロプレートから取り除く工程；

(工程5) 工程4で洗浄されたマイクロプレートに、必要に応じて発色物質と共に、用いた酵素の種類に依存して種々の基質(但し、工程3でペルオキシダーゼ等の酵素で標識した標識標準物質を用いた場合)またはアビジンあるいは酵素修飾アビジン(但し、工程3でビオチンで標識した標識標準物質を用いた場合)を加え、該基質、アビジンまたは酵素修飾アビジンと標識標準物質上の標識物質とを反応させる工程；

(工程6) 工程5で酵素修飾アビジンを加えた場合には、該修飾に用いた酵素の種類に依存して種々の基質を加え、アビジンに結合した酵素と基質を反応させる工程；

(工程7) マイクロプレートに反応停止液を加え、酵素反応及び発色反応を停止させる工程；及び

(工程8) 比色強度、蛍光強度あるいは発光強度を測定する工程。

本発明における「アフィニティークロマトグラフィー」とは、抗原と抗体、酵素と基質、あるいは受容体とそのリガンドといった物質間の相互作用(親和性)を利用することにより、試料(例えば、血清及び血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等)中に含まれる目的物質を分離または精製する方法を意味する。

【0091】本発明の方法は、受容体とそのリガンドとの親和性を利用する方法に関し、具体的には、酸化LDL受容体と、そのリガンドである酸化LDL等の変性LDLとの親和性を利用することにより、試料(例えば、血清及び血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等)中に含まれる酸化LDL等の変性LDLを分離、精製する方法に関する。さらに具体的には、(1) 前述のような不溶性担体であるフィルターあるいはメンブレン等に本発明の融合ポリペプチドを固定化した後、該フィルターあるいはメンブレンに試料を接触させることにより該試料中に含まれる酸化LDL等の変性LDLを分離する方法、及び(2) 前述のようなセルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等のような不溶性担体上に本発明の融合ポリペプチドを常法により固定化(物理的吸着、架橋による高分子化、マトリックス中への封印あるいは非共有結合等による固定化)し、該不溶性担体をガラス製、プラスチック製あるいはステンレス製等のカラムに充填し、該カラム(例えば、円柱状カラム)に、試料(例えば、血清及び血漿等の体液試料、培養上清あるいは遠心上清等)を通して溶出させることにより、該試料中に含まれる酸化LDL等の変性LDLを分離あるいは精製する方法である。後者(2)の方法を特にアフィニティークロマトグラフィーという。

【0092】該アフィニティークロマトグラフィーに用いられる前記不溶性担体としては、本発明の融合ポリペプチドを固定化でき得るものであればどのような不溶性担体でも使用できる。例えば、市販品である、ファルマシア(Pharmacia)社(製)のSephacrose 2B、Sephacrose 4B、Sephacrose 6B、CNBr-activated Sepharose 4B、AH-Sepharose 4B、CH-Sepharose 4B、Activated CH-Sepharose 4B、Epoxy-activated Sepharose 6B、Activated thiol-Sepharose 4B、Sephadex、CM-Sephadex、ECH-Sepharose 4B、EAB-Sepharose 4B、NHS-activated SepharoseあるいはThiopropyl Sepharose 6B等、バイオラッド(Bio-Rad)社(製)のBio-Gel A、Cellex、Cellex A E、Cellex-CM、Cellex PAB、Bio-Gel P、Hydrazide Bio-Gel P、Aminoethyl Bio-Gel P、Bio-Gel CM、Affi-Gel

10、Affi-Gel 15、Affi-Prep 10、Affi-Gel Hz、Affi-Prep Hz、Affi-Gel 102、CM Bio-Gel A、Affi-Gel heparin、Affi-Gel 501あるいはAffi-Gel 601等、和光純薬工業社（製）のクロマゲルA、クロマゲルP、エンザフィックス P-HZ、エンザフィックス P-SHあるいはエンザフィックス P-AB等、セルバ(Serva)社（製）のAE-Cellulose、CM-CelluloseあるいはPAB Cellulose等を挙げることができる。

【0093】本発明における「医薬組成物」は、本発明の融合ポリペプチドを有効成分として、薬学的に許容され得る担体、即ち、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘潤剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等の一つ以上とともに医薬組成物とし、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トロリー剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態により経口あるいは非経口的に投与することができる。とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に0.1 μ g抗体/ml担体～10mg抗体/ml担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において1kg体重あたり、1 μ g～100mgの割合で、好ましくは50 μ g～50mgの割合で、1日あたり1回～数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。また、本発明の該医薬組成物は、酸化LDL受容体及び／または酸化LDL等の変性LDLの動態異常に起因する動脈硬化症や高脂血症等の種々疾患の予防及び治療において有用である。

【0094】

【実施例】以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明が該実施例に記載される態様のみに限定されるものではないことは言うまでもない。

【0095】【実施例1】融合ポリペプチドの調製
ウシ酸化LDL受容体LOX-1 (bLOX-1) をコードするcDNA (配列番号6) を、既報 (NATURE, Vol. 386, p. 73-77, 1997及び特開平9-98787号公報) に記載の方法と同様にして調製した。得られたcDNAを、2つのプライマー (5'-GGGGATCCTGATCTCATAAAGAAACAG-3' (配列番号8)、及び5'-GCGGATCCTGTGCTCTCAATAGATTCGC-3' (配列番号9)) を用いてPCRにより増幅し、BamHI切断部位が両端に付加されたウシLOX-1の細胞外領域をコードするcDNA (配列番号6の塩基番号215乃至844) を含むcDNA断片を調製した。ヒトIgG1のヒンジ領域、C α 12、及びC α 13の各々コードするエクソンを含むゲノミックDNAを含んでいるプラスミドpCds1neg1 (DNA and Cell Biol., Vol. 9,

p. 347-353, 1990参照。マサチューセッツ・ゼネラル・ホスピタルのシード博士 (B. Seed) から入手。配列番号7に記載の塩基配列を有する) を、BamHIで消化して線状化した。

【0096】前述のようにして得られたウシLOX-1の細胞外領域をコードするcDNAを、T4 DNAリガーゼを用いて、この線状化プラスミドのBamHI切断部位 (配列番号7の塩基番号169番目) に連結し、プラスミドpBLOX-1-Fcを構築した (図2)。10% FBS (fetal bovine serum) 含有HamF12培地中でサブコンフルエントに単層培養したCHO-K1細胞を、リポフェクタミン (Lipofectamine、GIBCO製) を用いて、pBLOX-1-Fc (1 μ g) 並びに発現プラスミドベクターpSVbsr (10ng、フナコシ製; bsr (Blasticidin S-resistance) 遺伝子及びSV40ウイルス由来のプロモーターを含む) により共形質転換した。

【0097】48時間の培養後、培地を、blasticidin-S (10 μ g/ml、フナコシ製) 含有HamF12培地に替えたさらに培養することにより、pBLOX-1-Fc及びpSVbsrで共形質転換された形質転換細胞を選択、取得した。得られた形質転換細胞は、10% FCS (fetal calf serum) 及びblasticidin-S (10 μ g/ml、フナコシ製) を含有するHamF12培地中で維持した。bLOX-1-Fcを精製するため、blasticidin-S (10 μ g/ml、フナコシ製) を含有するHamF12培地中でコンフルエントに培養した形質転換体CHO-K1細胞の培地をCHO-SFM-II (GIBCO/BRL製) に替え、3日間培養した。この操作を数回繰返した後、培養上清800mlを得た。培養上清中のbLOX-1-Fcは、Affi-Gel Protein A MAPS-II kit (Bio-rad製) を用いて次のように精製した。

【0098】培養上清を、予め結合緩衝液 (binding buffer) で平衡化したプロテインAアガロースゲルカラムに加えた。次いで、カラムを結合緩衝液 (15 bed volume) で洗浄した後、溶出緩衝液 (elution buffer, 5 bed volume) で溶出させた。溶出液を回収し、リン酸緩衝液で2回以上外液交換することにより透析し、精製bLOX-1-Fcを得た。得られた精製bLOX-1-Fcを、濃縮するためCentriprep (アミコン製) を用いて限外濾過した。BCA protein assay kit (PIERCE製) を用いて、866 μ g/mlの精製bLOX-1-Fcが得られたことを確認した。また、上記精製bLOX-1-Fcの取得は、下記ウェスタンブロッティングによっても確認した。精製bLOX-1-Fcを12.5% SDSアガロースゲル (第一化学) にアプライし、電気泳動した。泳動終了後、Immobilonメンブラン (ミリポア製) にブロッティングした。メンブランをBlock Ace (雪印製) で一晩ブロッキングした。一次抗体としてのビオチン標識ヤギ抗ヒトIgG抗体及びABCキット (Vector製) を用いて反応を行い、コニカイムノステインキットを用いて発色を行った (図3)。なお、bLOX-1-Fcのアミノ酸配列を配列番号3に、またbLOX-1-FcのcDNA配列を

配列番号4に示す。

【0099】[実施例2] 融合ポリペプチド固定化マイクロプレートの作成

実施例1で調製した精製bLOX-1-Fcでリン酸緩衝液で、 $5\mu\text{g/ml}$ に希釈した。該希釈液を、96穴マイクロプレート(Nunc製)の各ウェルに加え、 4°C で一晩インキュベートし、bLOX-1-Fcをマイクロプレートに吸着させた。次いで、各ウェルを、リン酸緩衝液で2回洗浄した。洗浄溶液を捨て、各ウェルに、ブロッキング試薬($320\mu\text{l}$ 、25%(v/v)、Block Ace)、大日本製薬(製)を加え室温で6時間インキュベートし、bLOX-1-Fcが結合していない部位をブロックした。各ウェルを、リン酸緩衝液で3回洗浄し、bLOX-1-Fc固定化マイクロプレートとした。

【0100】[実施例3] ヒト酸化LDLの標準物質の調製

健常人の血漿を、臭化カリウム(KBr)を加えて、比重を1.019に調整した後、Beckman L-80超遠心機で遠心し(20時間、58000rpm)、下層を別のチューブに回収した。回収した液量を測定し、臭化カリウムを加えて比重を1.063に調整した。次いで、Beckman L-80超遠心機で遠心し(20時間、58000rpm)、上層を別のチューブに回収した。回収した画分を、リン酸緩衝液で透析(外液を2回以上交換)し、精製ヒトLDLを得た。蛋白量をBCA protein assay kit(PIERCE製)を用いて測定した。蛋白量は、 10.3 mg/ml であった。

【0101】得られた精製LDLから酸化LDLを調製するため、精製LDL及び硫酸銅(CuSO_4)の濃度が、各々 3 mg/ml 及び $75\mu\text{M}$ となるように調整した溶液を、 CO_2 インキュベーター内で20時間インキュベートした。次いで、EDTAを含有する0.15Mの塩化ナトリウム溶液にて透析し(外液を2回以上交換)、ヒト酸化LDLを得た。蛋白量をBCA protein assay kit(PIERCE製)を用いて測定した。蛋白量は、 2.32 mg/ml であった。上記のように調製した精製LDL及び酸化LDLの各々を、アガロースゲル(Titan Gel Lipoproteins, ヘレナ研究所製)にのせ、アガロース電気泳動を行った(定電圧:90ボルト、25分間)。ゲルを 55°C の乾燥機中で乾燥させ、Fat red7B染色液を加え、脂質の染色を行った。次いで、70%メタノールで脱色させ、再度ゲルを 55°C の乾燥機中で乾燥させた。TBARS(過酸化脂質LPO)測定キット(LPOテストワコー(和光製))を用いて、脂質の酸化度を計測した。得られた脂質の酸化度は $24.74\text{ mol/mg protein}$ であった。このようにして得たヒト酸化LDLを標準物質として用いた。

【0102】[実施例4] ウサギ酸化LDLの標準物質の調製

日本白色ウサギの血漿を、臭化カリウム(KBr)を加えて、比重を1.019に調整した後、Beckman L-80超遠心機で遠心し(20時間、58000rpm)、下層を別のチューブ

に回収した。回収した液量を測定し、臭化カリウムを加えて比重を1.063に調整した。次いで、Beckman L-80超遠心機で遠心し(20時間、58000rpm)、上層を別のチューブに回収した。回収した画分を、リン酸緩衝液で透析(外液を2回以上交換)し、精製ウサギLDLを得た。蛋白量をBCA protein assay kit(PIERCE製)を用いて測定した。蛋白量は、 $895.6\mu\text{g/ml}$ であった。

【0103】得られた精製LDLから酸化LDLを調製するため、精製LDL及び硫酸銅(CuSO_4)の濃度が、各々 $100\mu\text{g/ml}$ 及び $75\mu\text{M}$ となるように調整した溶液を、 CO_2 インキュベーター内で20時間インキュベートした。次いで、EDTAを含有する0.15Mの塩化ナトリウム溶液にて透析し(外液を2回以上交換)、ウサギ酸化LDLを得た。蛋白量をBCA protein assay kit(PIERCE製)を用いて測定した。蛋白量は、 $307.1\mu\text{g/ml}$ であった。このようにして得たウサギ酸化LDLを標準物質として用いた。

【0104】[実施例5] 検量線の作成

<試験1>

実施例3で調製した精製ヒト酸化LDLの標準物質を、20%ウシ新生児血清(bovine newborn serum, GIBCO製)を含有するリン酸緩衝液で種々濃度(500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625及び 7.8125 ng/ml)に希釈し、実施例2で作成したbLOX-1-Fc固定化マイクロプレートの各ウェルに加え、 4°C で24時間インキュベートした。同様に、実施例4で調製した精製ウサギ酸化LDLの標準物質を、20%ウシ新生児血清(GIBCO製)を含有するリン酸緩衝液で種々濃度(10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125及び $0.15625\mu\text{g/ml}$)に希釈し、実施例2で作成したbLOX-1-Fc固定化マイクロプレートの各ウェルに加え、 4°C で24時間インキュベートした。

【0105】各々のプレートを、リン酸緩衝液で3回洗浄した後、1%B SA(bovine serum albumin)で1/1000に希釈したペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ヒトアポリポプロテインB抗体($100\mu\text{l}$ 、フナコシ製(コード番号:PP086))を各ウェルに加え、室温下で2時間インキュベートした。プレートをリン酸緩衝液で6回洗浄した後、各ウェルに、0.1Mのクエン酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5)中に溶解したオルトフェニレンジアミン(ortho-phenylene diamine、 $100\mu\text{g/ml}$ の $100\mu\text{l}$)及び0.02%過酸化水素を加え、室温下でインキュベートした。20分後、各ウェルに2M硫酸($50\mu\text{l}$)を加え、反応を停止させた。波長 490 nm での蛍光強度を96穴マイクロプレートリーダーで測定することにより酵素活性を求め、検量線を作成した。ウサギ酸化LDLの標準物質を用いた場合の検量線を図4に、またヒト酸化LDLの標準物質を用いた場合の検量線を図5に示す。ヒト酸化LDLの場合には、極めて低濃度である少なくとも約 7.8125 ng/ml から 500 ng/ml の濃度範囲で直線的検量線が得られた(相関係数: $r=0.997$)。ウサギ酸化LDLの

場合には、極めて低濃度である少なくとも約0.15625 μ g/mlから10 μ g/mlの濃度範囲で直線的検量線が得られた（相関係数： $r=0.996$ ）。

【0106】＜試験2＞

精製ヒト酸化LDL標準物質及び精製ウサギ酸化LDL標準物質の希釈濃度の範囲を下記のとおりさらに拡大して前記試験1と同様の方法により検量線を作成した。

（ヒト酸化LDL）

2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125及び3.90625 ng/ml

（ウサギ酸化LDL）

40、20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125及び0.15625 μ g/ml

ウサギ酸化LDLの標準物質を用いた場合の検量線を図7に、またヒト酸化LDLの標準物質を用いた場合の検量線を図8に示す。ヒト酸化LDLの場合には、極めて低濃度である少なくとも約3.90625 ng/mlから1000 ng/mlの濃度範囲で直線的検量線が得られた（相関係数： $r=0.996$ ）。ウサギ酸化LDLの場合には、極めて低濃度である少なくとも約0.15625 μ g/mlから10 μ g/mlの濃度範囲で直線的検量線が得られた（相関係数： $r=0.992$ ）。

【0107】〔実施例6〕 ウサギ酸化LDLの定量
正常日本白色ウサギ（17匹）及び高脂血症モデルウサギ（Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbit (WHHL), 12匹）の各々から採取した各々の血漿を、20%ウシ新生児血清（bovine newborn serum, GIBCO製）を含有するリン酸緩衝液で希釈した。希釈した各々の血漿（100 μ l）を、実施例2で作成したbLOX-1-Fc固定化マイクロプレートの各ウェルに加え、4℃で24時間インキュベートした。プレートを、リン酸緩衝液で3回洗浄した後、1%BSA（bovine serum albumin）で1/1000に希釈したペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ヒトアポリポrotein B抗体（100 μ l、フナコシ製（コード番号：PP086））を各ウェルに加え、室温下で2時間インキュベートした。プレートをリン酸緩衝液で6回洗浄した後、各ウェルに、0.1Mのクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）中に溶解したオルトフェニレンジアミン（o-phenylene diamine、100 μ g/mlの100 μ l）及び0.02%過酸化水素を加え、室温下でインキュベートした。20分後、各ウェルに2M硫酸（50 μ l）を加え、反応を停止させた。波長490nmのでの蛍光強度を96穴マイクロプレートリーダーで測定することにより酵素活性を求め、血漿に含まれる酸化LDLを定量した。結果を図6に示す。正常ウサギの血漿中の酸化LDL量は、有意に低濃度であり、一方、高脂血症モデルウサギの血漿中の酸化LDL量は、正常ウサギに比べ有意に高濃度であった。また、本実施例におけるウサギ酸化LDLの定量感度（検出感度）は、極めて高い定量感度（検出感度）であることが確認された。

【0108】〔実施例7〕 ヒト酸化LDLの定量
高脂血症患者（20名以上）並びに採血の時点で高脂血症の臨床症状が現れていない健康人（20名以上）の個々について、静脈からのヘパリン採血により血液を採取した。血液を遠心分離して血清を分離した（約3,000rpm、20分）。得られた血清を直ちにマイナス80℃に凍結し保存した。なお、被験者の平均年齢は約57.5歳であった（最低40歳、最高70歳）。凍結血清を冷蔵庫で溶解し、リン酸緩衝液で10倍に希釈し、実施例2で作成したbLOX-1-Fc固定化マイクロプレートの各ウェルに加え、4℃で24時間インキュベートした。プレートを、リン酸緩衝液で3回洗浄した後、1%BSA（bovine serum albumin）で1/1000に希釈したペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ヒトアポリポrotein B抗体（100 μ l、フナコシ製（コード番号：PP086））を各ウェルに加え、室温下で2時間インキュベートした。プレートをリン酸緩衝液で6回洗浄した後、各ウェルに、0.1Mのクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）中に溶解したオルトフェニレンジアミン（o-phenylene diamine、100 μ g/mlの100 μ l）及び0.02%過酸化水素を加え、室温下でインキュベートした。20分後、各ウェルに2M硫酸（50 μ l）を加え、反応を停止させた。波長490nmのでの蛍光強度を96穴マイクロプレートリーダーで測定することにより酵素活性を求め、血清に含まれる酸化LDLを定量した。結果を図9に示す。高脂血症患者血清中の変性LDL（LOX-1リガンド）の平均量は、健康人のそれに比べ約1.6倍であり、高脂血症患者では変性LDL（LOX-1リガンド）の量が有意に増加していることが確認された。

【0109】〔実施例8〕 医薬組成物の調製及び酸化LDL阻害活性

実施例1で調製した精製bLOX-1-Fc（1~200 μ g/ml）を注射用蒸留水（10ml）に加え注射剤とした。この注射剤を1~10 mg/kgの濃度で高脂血症モデルウサギ（WHHL）あるいは動脈硬化モデルウサギに静脈内投与（初回投与、0時間）し、引き続き10~30時間おきに同濃度で投与する。各投与後定期的に血漿を採取し、実施例6と同様にして各血漿試料中の酸化LDL量を測定する。bLOX-1-Fcが、ウサギ血中の酸化LDL量を低減することが期待できる。

【0110】

【発明の効果】本発明の融合ポリペプチド、具体的には、酸化LDL受容体（例えば、ヒトLOX-1）の細胞外領域と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の一部（例えば、ヒトIgGのFc）からなる融合ポリペプチドは、哺乳動物（例えば、健康人及び患者等）の体液中（例えば、血清及び血漿など）の酸化LDL等の変性LDLを検出及び定量するためのアッセイにおける構成要素として有用であるだけでなく、該酸化LDL等の変性LDLの分離及び精製における構成要素としても有用

である。本発明の融合タンパクを用いることにより、動脈硬化症や高脂血症等の疾患に罹患した患者の体液中に存在する酸化LDL等の変性LDLを、インタクト (intact) な状態で簡便かつ高感度で検出及び定量でき、また臨床上で汎用可能な定量方法及び検出方法、並びに該方法に用いられるキットを提供できる。本発明の検出方法及び定量方法並びにキットは、動脈硬化症や高脂血症等の種々疾患の診断において極めて有用である。また、本発明の融合ポリペプチドは、IgG等の免疫グロブリンの定常領域の一部 (例えば、Fc) を融合パートナーとして有することから、該免疫グロブリン断片に特異的に結合するというプロテインAの性質を用いたアフィニティカラムクロマトグラフィーを用いることにより該融

合ポリペプチドを極めて容易に精製することが可能である。さらに、種々の免疫グロブリンのFcに対する種々の抗体が提供されていることから、該Fcに対する抗体を用いて、該融合ポリペプチドのイムノアッセイを簡便に行うことができる。本発明の融合ポリペプチドは、前記のような酸化LDL等の変性LDLのアッセイ (検出、定量など) 並びに分離及び精製におけるツールとして有用であるだけでなく、それ自体が、動脈硬化症や高脂血症等の疾患の予防及び治療のための医薬品の有効成分として極めて有用である。

【0111】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Tobacco, Inc.

<120> Method to quantify denaturated LDL

<130> J98-0225

<140>

<141>

<150> JP P1997-364981

<151> 1997-12-19

<150> JP P1998-349648

<151> 1998-12-9

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 273

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Thr Phe Asp Asp Leu Lys Ile Gln Thr Val Lys Asp Gln Pro Asp
  1             5             10             15
Glu Lys Ser Asn Gly Lys Lys Ala Lys Gly Leu Gln Phe Leu Tyr Ser
                20             25             30
Pro Trp Trp Cys Leu Ala Ala Ala Thr Leu Gly Val Leu Cys Leu Gly
                35             40             45
Leu Val Val Thr Leu Met Val Leu Gly Met Gln Leu Ser Gln Val Ser
                50             55             60
Asp Leu Leu Thr Gln Glu Gln Ala Asn Leu Thr His Gln Lys Lys Lys
                65             70             75             80
Leu Glu Gly Gln Ile Ser Ala Arg Gln Gln Ala Glu Glu Ala Ser Gln
                85             90             95
Glu Ser Glu Asn Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr Leu Ala Arg Lys
                100            105            110
Leu Asn Glu Lys Ser Lys Glu Gln Met Glu Leu His His Gln Asn Leu
                115            120            125
Asn Leu Gln Glu Thr Leu Lys Arg Val Ala Asn Cys Ser Ala Pro Cys
                130            135            140
Pro Gln Asp Trp Ile Trp His Gly Glu Asn Cys Tyr Leu Phe Ser Ser
                145            150            155            160
```

Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Lys Cys Leu Ser Leu Asp
 165 170 175
 Ala Lys Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr Ala Asp Leu Asp Phe Ile Gln
 180 185 190
 Gln Ala Ile Ser Tyr Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met Gly Leu Ser Arg
 195 200 205
 Arg Asn Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Trp Glu Asp Gly Ser Pro Leu Met
 210 215 220
 Pro His Leu Phe Arg Val Arg Gly Ala Val Ser Gln Thr Tyr Pro Ser
 225 230 235 240
 Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly Ala Val Tyr Ala Glu Asn Cys
 245 250 255
 Ile Leu Ala Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu Arg Ala
 260 265 270
 Gln
 <;210>; 2
 <;211>; 270
 <;212>; PRT
 <;213>; Bovine
 <;400>; 2
 Met Thr Val Asp Asp Pro Lys Gly Met Lys Asp Gln Leu Asp Gln Lys
 1 5 10 15
 Pro Asn Gly Lys Thr Ala Lys Gly Phe Val Ser Ser Trp Arg Trp Tyr
 20 25 30
 Pro Ala Ala Val Thr Leu Gly Val Leu Cys Leu Gly Leu Leu Val Thr
 35 40 45
 Val Ile Leu Leu Ile Leu Gln Leu Ser Gln Val Ser Asp Leu Ile Lys
 50 55 60
 Lys Gln Gln Ala Asn Ile Thr His Gln Glu Asp Ile Leu Glu Gly Gln
 65 70 75 80
 Ile Leu Ala Gln Arg Arg Ser Glu Lys Ser Ala Gln Glu Ser Gln Lys
 85 90 95
 Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr Leu Ala His Lys Leu Asp Glu Lys
 100 105 110
 Ser Lys Lys Leu Met Glu Leu His Arg Gln Asn Leu Asn Leu Gln Glu
 115 120 125
 Val Leu Lys Glu Ala Ala Asn Tyr Ser Gly Pro Cys Pro Gln Asp Trp
 130 135 140
 Leu Trp His Glu Glu Asn Cys Tyr Gln Phe Ser Ser Gly Ser Phe Asn
 145 150 155 160
 Trp Glu Lys Ser Gln Glu Asn Cys Leu Ser Leu Asp Ala His Leu Leu
 165 170 175
 Lys Ile Asn Ser Thr Asp Glu Leu Glu Phe Ile Gln Gln Met Ile Ala
 180 185 190
 His Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met Gly Leu Ser Met Arg Lys Pro Asn
 195 200 205
 Tyr Ser Trp Leu Trp Glu Asp Gly Thr Pro Leu Thr Pro His Leu Phe
 210 215 220
 Arg Ile Gln Gly Ala Val Ser Arg Met Tyr Pro Ser Gly Thr Cys Ala
 225 230 235 240

Tyr Ile Gln Arg Gly Thr Val Phe Ala Glu Asn Cys Ile Leu Thr Ala
 245 250 255

Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu Leu Arg Ala Gln
 260 265 270

<;210>; 3

<;211>; 445

<;212>; PRT

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence:Chimeric protein
 consisting of extracellular region of bovine LOX-1 and
 Fc region of human immunoglobulin IgG1

<;400>; 3

Asp Leu Ile Lys Lys Gln Gln Ala Asn Ile Thr His Gln Glu Asp Ile
 1 5 10 15

Leu Glu Gly Gln Ile Leu Ala Gln Arg Arg Ser Glu Lys Ser Ala Gln
 20 25 30

Glu Ser Gln Lys Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr Leu Ala His Lys
 35 40 45

Leu Asp Glu Lys Ser Lys Lys Leu Met Glu Leu His Arg Gln Asn Leu
 50 55 60

Asn Leu Gln Glu Val Leu Lys Glu Ala Ala Asn Tyr Ser Gly Pro Cys
 65 70 75 80

Pro Gln Asp Trp Leu Trp His Glu Glu Asn Cys Tyr Gln Phe Ser Ser
 85 90 95

Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Asn Cys Leu Ser Leu Asp
 100 105 110

Ala His Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr Asp Glu Leu Glu Phe Ile Gln
 115 120 125

Gln Met Ile Ala His Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met Gly Leu Ser Met
 130 135 140

Arg Lys Pro Asn Tyr Ser Trp Leu Trp Glu Asp Gly Thr Pro Leu Thr
 145 150 155 160

Pro His Leu Phe Arg Ile Gln Gly Ala Val Ser Arg Met Tyr Pro Ser
 165 170 175

Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly Thr Val Phe Ala Glu Asn Cys
 180 185 190

Ile Leu Thr Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu Leu Arg
 195 200 205

Ala Gln Asp Pro Glu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

```

290          295          300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305          310          315          320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
          325          330          335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
          340          345          350
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
          355          360          365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
          370          375          380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385          390          395          400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
          405          410          415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
          420          425          430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          435          440          445
<;210>; 4
<;211>; 1335
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: DNA encoding
          a chimeric protein consisting of extracellular
          region of bovine LOX-1 and Fc region of human
          immunoglobulin IgG1
<;400>; 4
gat ctc ata aag aaa cag caa gca aat att act cac cag gaa gat atc 48
Asp Leu Ile Lys Lys Gln Gln Ala Asn Ile Thr His Gln Glu Asp Ile
   1           5           10          15
ctg gag gga cag att tta gcc cag cgc cga tca gaa aaa tct gcc cag 96
Leu Glu Gly Gln Ile Leu Ala Gln Arg Arg Ser Glu Lys Ser Ala Gln
          20           25           30
gag tca cag aag gaa ctc aaa gaa atg ata gaa acc ctt gcc cac aag 144
Glu Ser Gln Lys Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr Leu Ala His Lys
          35           40           45
ctg gat gag aaa tcc aag aaa cta atg gaa ctt cac cgc cag aac ctg 192
Leu Asp Glu Lys Ser Lys Lys Leu Met Glu Leu His Arg Gln Asn Leu
          50           55           60
aat ctc caa gaa gtt ctg aaa gag gca gca aac tat tca ggt cct tgt 240
Asn Leu Gln Glu Val Leu Lys Glu Ala Ala Asn Tyr Ser Gly Pro Cys
          65           70           75           80
ccc caa gac tgg ctc tgg cat gaa gaa aac tgt tac caa ttt tcc tct 288
Pro Gln Asp Trp Leu Trp His Glu Glu Asn Cys Tyr Gln Phe Ser Ser
          85           90           95
ggc tct ttt aat tgg gaa aaa agc cag gag aac tgc ttg tct ttg gat 336
Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Asn Cys Leu Ser Leu Asp
          100          105          110

```

```

gcc cac ttg ctg aag att aat agc aca gat gaa ctg gaa ttc atc cag 384
Ala His Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr Asp Glu Leu Glu Phe Ile Gln
      115              120              125
caa atg att gcc cat tcc agt ttc ccc ttc tgg atg ggg ttg tca atg 432
Gln Met Ile Ala His Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met Gly Leu Ser Met
      130              135              140
agg aaa ccc aat tac tcc tgg ctt tgg gaa gat ggt act cct ttg acg 480
Arg Lys Pro Asn Tyr Ser Trp Leu Trp Glu Asp Gly Thr Pro Leu Thr
      145              150              155              160
ccc cac ttg ttt aga att cag gga gct gtt tcc cgt atg tat cct tca 528
Pro His Leu Phe Arg Ile Gln Gly Ala Val Ser Arg Met Tyr Pro Ser
      165              170              175
ggg acc tgt gca tat att caa agg gga act gtt ttt gct gaa aac tgc 576
Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly Thr Val Phe Ala Glu Asn Cys
      180              185              190
att tta act gca ttc agt ata tgt caa aag aag gcg aat cta ttg aga 624
Ile Leu Thr Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu Leu Arg
      195              200              205
gca cag gat ccc gag gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc 672
Ala Gln Asp Pro Glu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
      210              215              220
cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc 720
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
      225              230              235              240
ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag 768
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
      245              250              255
gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag 816
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
      260              265              270
ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag 864
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
      275              280              285
ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc 912
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
      290              295              300
acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag 960
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
      305              310              315              320
gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa 1008
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
      325              330              335
gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc 1056
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
      340              345              350
cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa 1104
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
      355              360              365
ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag 1152
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

```

```

370          375          380
ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc 1200
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385          390          395          400
tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag 1248
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
          405          410          415
cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac 1296
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
          420          425          430
cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa 1335
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          435          440          445
<;210>; 5
<;211>; 1318
<;212>; DNA
<;213>; Homo sapiens
<;220>;
<;221>; 5'UTR
<;222>; (1)..(126)
<;220>;
<;221>; CDS
<;222>; (127)..(948)
<;220>;
<;221>; 3'UTR
<;222>; (949)..(1318)
<;400>; 5
ggggccgcac tagtgattct gggtcggccc acctctgaag gtccagaat cgatagttaa 60
ttcgtgattt tagttgttg aagttcgtga ctgcttcaact ctctcattct tagcttgaat 120
ttggaa atg act ttt gat gac cta aag atc cag act gtg aag gac cag 168
Met Thr Phe Asp Asp Leu Lys Ile Gln Thr Val Lys Asp Gln
          1          5          10
cct gat gag aag tca aat gga aaa aaa gct aaa ggt ctt cag ttt ctt 216
Pro Asp Glu Lys Ser Asn Gly Lys Lys Ala Lys Gly Leu Gln Phe Leu
          15          20          25          30
tac tct cca tgg tgg tgc ctg gct gct gcg act cta ggg gtc ctt tgc 264
Tyr Ser Pro Trp Trp Cys Leu Ala Ala Ala Thr Leu Gly Val Leu Cys
          35          40          45
ctg gga tta gta gtg acc att atg gtg ctg ggc atg caa tta tcc cag 312
Leu Gly Leu Val Val Thr Leu Met Val Leu Gly Met Gln Leu Ser Gln
          50          55          60
gtg tct gac ctc cta aca caa gag caa gca aac cta act cac cag aaa 360
Val Ser Asp Leu Leu Thr Gln Glu Gln Ala Asn Leu Thr His Gln Lys
          65          70          75
aag aaa ctg gag gga cag atc tca gcc cgg caa caa gca gaa gaa gct 408
Lys Lys Leu Glu Gly Gln Ile Ser Ala Arg Gln Gln Ala Glu Glu Ala
          80          85          90
tca cag gag tca gaa aac gaa ctc aag gaa atg ata gaa acc ctt gct 456
Ser Gln Glu Ser Glu Asn Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr Leu Ala
          95          100          105          110

```

```

cgg aag ctg aat gag aaa tcc aaa gag caa atg gaa ctt cac cac cag 504
Arg Lys Leu Asn Glu Lys Ser Lys Glu Gln Met Glu Leu His His Gln
      115      120      125
aat ctg aat ctc caa gaa aca ctg aag aga gta gca aat tgt tca gct 552
Asn Leu Asn Leu Gln Glu Thr Leu Lys Arg Val Ala Asn Cys Ser Ala
      130      135      140
cct tgt ccg caa gac tgg atc tgg cat gga gaa aac tgt tac cta ttt 600
Pro Cys Pro Gln Asp Trp Ile Trp His Gly Glu Asn Cys Tyr Leu Phe
      145      150      155
tcc tcg ggc tca ttt aac tgg gaa aag agc caa gag aag tgc ttg tct 648
Ser Ser Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Lys Cys Leu Ser
      160      165      170
ttg gat gcc aag ttg ctg aaa att aat agc aca gct gat ctg gac ttc 696
Leu Asp Ala Lys Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr Ala Asp Leu Asp Phe
      175      180      185      190
atc cag caa gca att tcc tat tcc agt ttt cca ttc tgg atg ggg ctg 744
Ile Gln Gln Ala Ile Ser Tyr Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met Gly Leu
      195      200      205
tct cgg agg aac ccc agc tac cca tgg ctc tgg gag gac ggt tct cct 792
Ser Arg Arg Asn Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Trp Glu Asp Gly Ser Pro
      210      215      220
ttg atg ccc cac tta ttt aga gtc cga ggc gct gtc tcc cag aca tac 840
Leu Met Pro His Leu Phe Arg Val Arg Gly Ala Val Ser Gln Thr Tyr
      225      230      235
cct tca ggt acc tgt gca tat ata caa cga gga gct gtt tat gcg gaa 888
Pro Ser Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly Ala Val Tyr Ala Glu
      240      245      250
aac tgc att tta gct gcc ttc agt ata tgt cag aag aag gca aac cta 936
Asn Cys Ile Leu Ala Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu
      255      260      265      270
aga gca cag tga attgaagc tctggaagaa aagaaaaag tctttgagtt 988
Arg Ala Gln
ttattctgga atttaagcta ttctttgtca cttgggtgcc aaacatgaga gccagaaaa 1048
ctgtcattta gctggetgca gaactccttt gcagaaactg gggttcagg tgccctggcac 1188
ctttatgtca acatttttga ttctagctat ctgtattatt tcacctaget tgteccaagc 1168
ttccctgccca gctgaagtc cattttcccc tttttatttt aaaatttgac tctctttcaa 1228
gcttgaaaac cctctgaact cagtcttctt tacctcatta tcaccttccc ctcacactcc 1288
taaaattgca tgaaagacag accggaattc 1318

```

<210>: 6

<211>: 1897

<212>: DNA

<213>: Bovine

<220>:

<221>: 5'UTR

<222>: (1)..(34)

<220>:

<221>: CDS

<222>: (35)..(847)

<220>:

<221>: 3'UTR

gcttcactct ctcattcttg gaatacatitt gaaa atg act gtt gat gac ccc	52
Met thr Val Asp Asp Pro	
1 5	
aag ggt atg aaa gat caa ctt gat cag aag cca aat ggc aag aca gca	100
Lys Gly Met Lys Asp Gln Leu Asp Gln Lys Pro Asn Gly Lys Thr Ala	
10 15 20	
aaa ggt ttt gtt tcc tct tgg agg tgg tac cct gct gct gtg act cta	148
Lys Gly Phe Val Ser Ser Trp Arg Trp Tyr Pro Ala Ala Val Thr Leu	
25 30 35	
ggg gtc ctt tgt ctg gga tta ctg gtg act gtt ata ttg ttg ata ctg	196
Gly Val Leu Cys Leu Gly Leu Leu Val Thr Val Ile Leu Leu Ile Leu	
40 45 50	
caa tta tcc cag gtc tct gat ctc ata aag aaa cag caa gca aat att	244
Gln Leu Ser Gln Val Ser Asp Leu Ile Lys Lys Gln Gln Ala Asn Ile	
55 60 65 70	
act cac cag gaa gat atc ctg gag gga cag att tta gcc cag cgc cga	292
Thr His Gln Glu Asp Ile Leu Glu Gly Gln Ile Leu Ala Gln Arg Arg	
75 80 85	
tca gaa aaa tct gcc cag gag tca cag aag gaa ctc aaa gaa atg ata	340
Ser Glu Lys Ser Ala Gln Glu Ser Gln Lys Glu Leu Lys Glu Met Ile	
90 95 100	
gaa acc ctt gcc cac aag ctg gat gag aaa tcc aag aaa cta atg gaa	388
Glu thr Leu Ala His Lys Leu Asp Glu Lys Ser Lys Lys Leu Met Glu	
105 110 115	
ctt cac cgc cag aac ctg aat ctc caa gaa gtt ctg aaa gag gca gca	436
Leu His Arg Gln Asn Leu Asn Leu Gln Glu Val Leu Lys Glu Ala Ala	
120 125 130	
aac tat tca ggt cct tgt ccc caa gac tgg ctc tgg cat gaa gaa aac	484
Asn Tyr Ser Gly Pro Cys Pro Gln Asp Trp Leu Trp His Glu Glu Asn	
135 140 145 150	
tgt tac caa ttt tcc tct ggc tct ttt aat tgg gaa aaa agc cag gag	532
Cys Tyr Gln Phe Ser Ser Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu	
155 160 165	
aac tgc ttg tct ttg gat gcc cac ttg ctg aag att aat agc aca gat	580
Asn Cys Leu Ser Leu Asp Ala His Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr Asp	
170 175 180	
gaa ctg gaa ttc atc cag caa atg att gcc cat tcc agt ttc ccc ttc	628
Glu Leu Glu Phe Ile Gln Gln Met Ile Ala His Ser Ser Phe Pro Phe	
185 190 195	
tgg atg ggg ttg tca atg agg aaa ccc aat tac tgc tgg ctt tgg gaa	676
Trp Met Gly Leu Ser Met Arg Lys Pro Asn Tyr Ser Trp Leu Trp Glu	
200 205 210	

```

gat ggt act cct ttg acg ccc cac ttg ttt aga att cag gga gct gtt 724
Asp Gly Thr Pro Leu Thr Pro His Leu Phe Arg Ile Gln Gly Ala Val
215          220          225          230
tcc cgt atg tat cct tca ggg acc tgt gca tat att caa agg gga act 772
Ser Arg Met Tyr Pro Ser Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly Thr
          235          240          245
gtt ttt gct gaa aac tgc att tta act gca ttc agt ata tgt caa aag 820
Val Phe Ala Glu Asn Cys Ile Leu Thr Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys
          250          255          260
aag gcg aat cta ttg aga gca cag tga atttgaagga tctggaggaa 867
Lys Ala Asn Leu Leu Arg Ala Gln
          265          270

```

```

aagaaggaaa cctttgaatt ctcttctgga atttaagcta tacttcatca cttagatgta 927
aaccattaga gcccaggaa atgcctgcta ctggttgagt gcagaactcc ttagcagaga 987
ctggcccagc tgcctggcac ctgatagca aaagttgcaa ttcctctgt atattttcc 1047
ctaactgtt ccaagtctc cctgcagga cttcagagaa gtcaatttt ctgtttccat 1107
tgtttctaag aacttgttc ctaactcaag gtcacagcat tttctcact tttgtcctat 1167
gctttcttct aggcattgta gagttttaga tttacatgg aaatctagaa cttattttag 1227
attaatttct aagtatata tggatgatg gaagtttct gttgttttt tgettgtgag 1287
tattcaattg ttttgcaac atttctgaa aagactattc ttccttact acattgcctt 1347
tgcactgttg tcaacaatta tccatacatg cctggetcta tttctggatt tctattcct 1407
ttccatttat ttattatta ttcttgctt acaacatcac catgatattt tgaattctat 1467
ggttctttaa tatatcttg aatcacatgg tagtagttat tcattgttgt tcttttttag 1527
agttgtttgg ttaatctatg cttttgtatt tctgtcttaa attggttgt ccatittctaa 1587
aaaaacttga aattttgaat tgcactgaat ccatacataa atttagggaa aattgaattc 1647
ttaaanaaac tgatttgtc aatcatgaa aaagtgatg tgetctattt aggtattcct 1707
tattttcttt aagcaatgct ttttaatggt ctttgtgtag atattgttag attatcatca 1767
tgtatttcaac attatttatg ctactgtaga tagtattgtt atcatttgtt gttcttattt 1827
tcaaagtctt ctgctagtat gtagaattat aataaagttt gatattaata ttaaaaaaaa 1887
aaaaaaaaa 1897

```

<;210>; 7

<;211>; 1459

<;212>; DNA

<;213>; Artificial Sequence

<;220>;

<;223>; Description of Artificial Sequence: Vector DNA of pCd5lneg1
containing genomic DNA comprising exons encoding a Fc region
of human immunoglobulin IgG1

<;400>; 7

```

ctcgagatcc attgtgctct aaaggagata cccggccaga caccctcacc tgcggtgcc 60
agctgccag gctgaggcaa gagaaggcca gaaacc atg ccc atg ggg tct ctg 114
          Met Pro Met Gly Ser Leu
          1          5
caa ccg ctg gcc acc ttg tac ctg ctg ggg atg ctg gtc gct tcc gtg 162
Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly Met Leu Val Ala Ser Val
          10          15          20
cta gcg gat ccc gag ggtgagtact aagcttcagc gctcctgcct ggacgcatcc 217
Leu Ala Asp Pro Glu
          25
cggtatgca gccccagtc agggcagcaa ggcagccccc gtctgctct tcacccggag 277

```

ccctgcgcg cccactcat gctcaggag agggctctct gctttttcc caggetctgg	337
gcaggcacag gctagtgcc cctaaccag gccctgcaca caaaggggca ggtgctgggc	397
tcagacctgc caagagccat atccgggagg acctgcctcc tgacctagc ccaccccaaa	457
ggccaaactc tccactccct cagctcggac acctctctct ctcccagatt ccagtaactc	517
ccaatcttct ctctgca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc	567
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys	
30 35	
cca ccg tgc cca ggtaagccag cccaggcctc gccctccagc tcaaggcggg	619
Pro Pro Cys Pro	
40	
acaggtgccc tagagtagcc tgcattccagg gacaggcccc agccgggtgc tgacacgtcc	679
acctccatct ctctctca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc	730
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe	
45 50	
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct	778
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro	
55 60 65	
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc	826
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val	
70 75 80 85	
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca	874
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr	
90 95 100	
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc	922
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val	
105 110 115	
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc	970
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	
120 125 130	
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc	1018
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser	
135 140 145	
aaa gcc aaa ggtgggaccc gtgggtgcg agggccacat ggacagaggc	1067
Lys Ala Lys	
150	
cgctcggcc caccctctgc cctgagagtg accgtgtac caacctctgt cctaca ggg	1126
Gly	
cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag	1174
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu	
155 160 165	
ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat	1222
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	
170 175 180 185	
ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac	1270
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	
190 195 200	
aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc	1318
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
205 210 215	
ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac	1366

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 220 225 230
 gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg 1414
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 235 240 245
 cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga gtgcgacggc cg 1459
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 250 255
 <;210>; 8
 <;211>; 27
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
 synthesized primer sequence
 <;220>;
 <;221>; primer_bind
 <;222>; (1)..(27)
 <;400>; 8
 ggggatcctg atctcataaa gaaacag 27
 <;210>; 9
 <;211>; 28
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence:Artificially
 synthesized primer sequence
 <;220>;
 <;221>; primer_bind
 <;222>; (1)..(28)
 <;400>; 9
 gcggatcctg tgctctcaat agattcgc 28
 <;210>; 10
 <;211>; 1921
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Description of Artificial Sequence: DNA consisting of
 a DNA encoding an extracellular region of bovine LOX-1
 and genomic DNA comprising exons encoding a Fc region
 of human immunoglobulin IgG1
 <;400>; 10
 gat ctc ata aag aaa cag caa gca aat att act cac cag gaa gat atc 48
 Asp Leu Ile Lys Lys Gln Gln Ala Asn Ile Thr His Gln Glu Asp Ile
 1 5 10 15
 ctg gag gga cag att tta gcc cag cgc cga tca gaa aaa tct gcc cag 96
 Leu Glu Gly Gln Ile Leu Ala Gln Arg Arg Ser Glu Lys Ser Ala Gln
 20 25 30
 gag tca cag aag gaa ctc aaa gaa atg ata gaa acc ctt gcc cac aag 144
 Glu Ser Gln Lys Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr Leu Ala His Lys

35	40	45	
ctg gat gag aaa tcc aag aaa cta atg gaa ctt cac cgc cag aac ctg	192		
Leu Asp Glu Lys Ser Lys Lys Leu Met Glu Leu His Arg Gln Asn Leu			
50	55	60	
aat ctc caa gaa gtt ctg aaa gag gca gca aac tat tca ggt cct tgt	240		
Asn Leu Gln Glu Val Leu Lys Glu Ala Ala Asn Tyr Ser Gly Pro Cys			
65	70	75	80
ccc caa gac tgg ctc tgg cat gaa gaa aac tgt tac caa ttt tcc tct	288		
Pro Gln Asp Trp Leu Trp His Glu Glu Asn Cys Tyr Gln Phe Ser Ser			
85	90	95	
ggc tct ttt aat tgg gaa aaa agc cag gag aac tgc ttg tct ttg gat	336		
Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Asn Cys Leu Ser Leu Asp			
100	105	110	
gcc cac ttg ctg aag att aat agc aca gat gaa ctg gaa ttc atc cag	384		
Ala His Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr Asp Glu Leu Glu Phe Ile Gln			
115	120	125	
caa atg att gcc cat tcc agt ttc ccc ttc tgg atg ggg ttg tca atg	432		
Gln Met Ile Ala His Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met Gly Leu Ser Met			
130	135	140	
agg aaa ccc aat tac tcc tgg ctt tgg gaa gat ggt act cct ttg acg	480		
Arg Lys Pro Asn Tyr Ser Trp Leu Trp Glu Asp Gly Thr Pro Leu Thr			
145	150	155	160
ccc cac ttg ttt aga att cag gga gct gtt tcc cgt atg tat cct tca	528		
Pro His Leu Phe Arg Ile Gln Gly Ala Val Ser Arg Met Tyr Pro Ser			
165	170	175	
ggg acc tgt gca tat att caa agg gga act gtt ttt gct gaa aac tgc	576		
Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly Thr Val Phe Ala Glu Asn Cys			
180	185	190	
att tta act gca ttc agt ata tgt caa aag aag gcg aat cta ttg aga	624		
Ile Leu Thr Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu Leu Arg			
195	200	205	
gca cag gat ccc gag ggtgagtact aagcttcagc gctcctgcct ggacgcatcc	679		
Ala Gln Asp Pro Glu			
210			
cgctatgca gcccagtc agggcagcaa ggcaggcccc gtctgcctct tcacccggag	739		
ctctgccc cccactcat gctcaggag agggctttct ggctttttcc caggctctgg	799		
gcaggcacag gctaggtgcc cctaaccag gccctgcaca caaaggggca ggtgctgggc	859		
tcagacctgc caagagccat atccgggagg accctgcccc tgacctaaag ccaccccaaa	919		
ggccaaactc tccactccct cagctcggac accttctctc ctccagatt ccagtaactc	979		
ccaatcttct ctctgca gag ccc aaa tet tgt gac aaa act cac aca tgc	1029		
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys			
215	220		
cca ceg tgc cca ggtaagccag ccagggctc gccctccagc tcaaggcggg	1081		
Pro Pro Cys Pro			
225			
acagtgccc tagagtagcc tgcattccagg gacaggcccc agccgggtgc tgacacgtcc	1141		
acctccatct ctctctca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc	1192		
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe			
230	235		
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc egg acc cct	1240		

```

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
240                245                250                255
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc 1288
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
                260                265                270
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca 1336
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
                275                280                285
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc 1384
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
                290                295                300
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc 1432
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
                305                310                315
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc 1480
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                320                325                330                335
aaa gcc aaa ggtgggaccc gtgggtgacg agggccacat ggacagaggc 1529
Lys Ala Lys
cggtctggcc caccctctgc cctgagagt accgctgtac caacctctgt cctaca 1585
ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat 1633
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
                340                345                350
gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc 1681
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
                355                360                365                370
tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag 1729
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
                375                380                385
aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc 1777
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
                390                395                400
ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg 1825
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
                405                410                415
aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac 1873
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
                420                425                430
acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga gtgcgacggc cg 1921
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                435                440                445

```

【0112】「配列表フリーテキスト」

配列番号：3

他の情報：ウシLOX-1の細胞外領域とヒトイムノグロブリンIgG1のFcとからなる融合タンパク。

配列番号：4

他の情報：ウシLOX-1の細胞外領域とヒトイムノグロブリンIgG1のFcとからなる融合タンパクをコードするDNA。

配列番号：7

他の情報：ヒトイムノグロブリンIgG1のFcをコードするエクソンを含むゲノミックDNAを含むベクター (pCd51neg1) DNA。

配列番号：8

他の情報：人工的に合成したプライマー配列。

配列番号：9

他の情報：人工的に合成したプライマー配列。

配列番号：10

他の情報：ウシLOX-1の細胞外領域をコードするDNAとヒ

トイムノグロブリンIgG1のFcをコードするエクソンを含むゲノミックDNA。

【0113】

【図面の簡単な説明】

【図1】免疫グロブリン(IgG)の構造を模式的に示した図。

【図2】プラスミドpBLOX-1-Fcにおける、ウシLOX-1の細胞外領域をコードするcDNAとベクターDNAとの連結の状態を模式的に示す図。

【図3】ウェスタンブロッティングアッセイにおける、組換え融合ポリペプチド(bLOX-1-Fc)の電気泳動パターンを示す図。

【図4】本発明の定量法によるウサギ由来酸化LDL標

準物質の検量線を示す図。

【図5】本発明の定量法によるヒト由来酸化LDL標準物質の検量線を示す図。

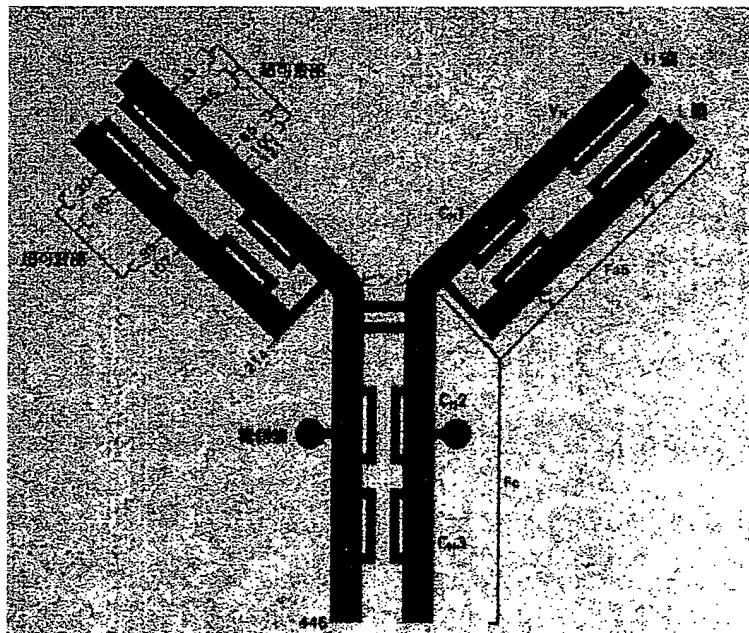
【図6】本発明の定量法により測定した正常ウサギ及び高脂血漿モデルウサギの血漿中の酸化LDLの量を示す図。

【図7】本発明の定量法によるウサギ由来酸化LDL標準物質の検量線を示す図。

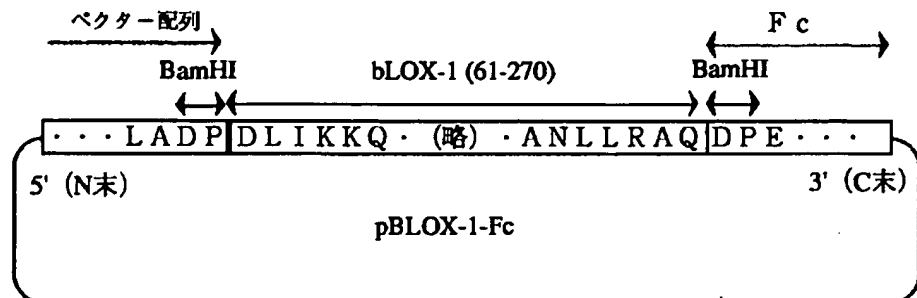
【図8】本発明の定量法によるヒト由来酸化LDL標準物質の検量線を示す図。

【図9】本発明の定量法により測定した健常人及び高脂血症患者の血清中の変性LDLの量を示す図。

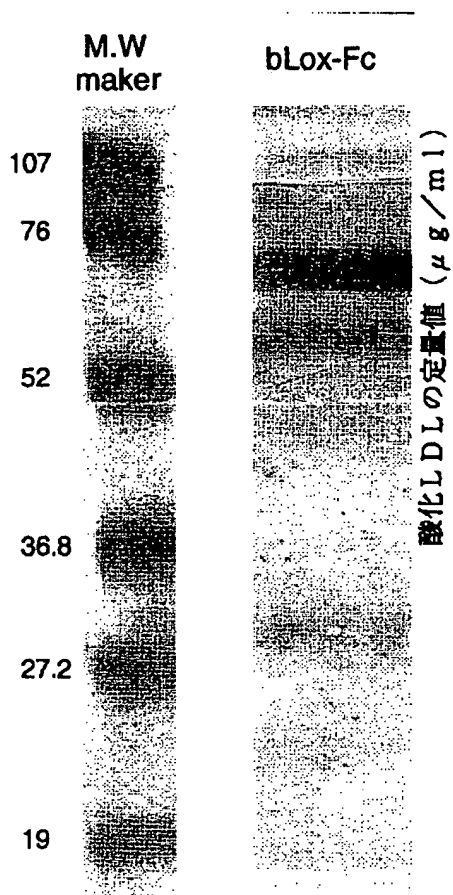
【図1】



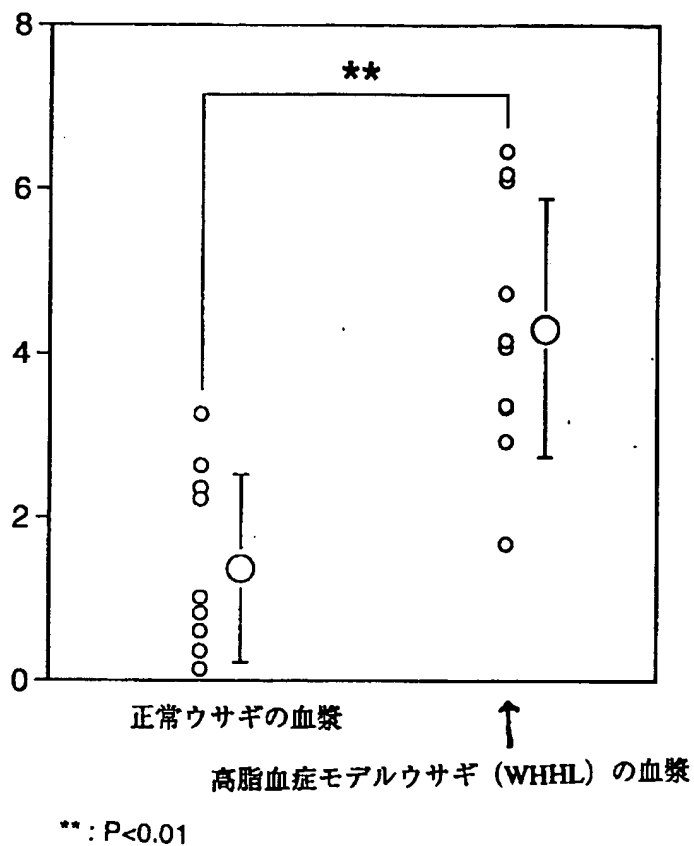
【図2】



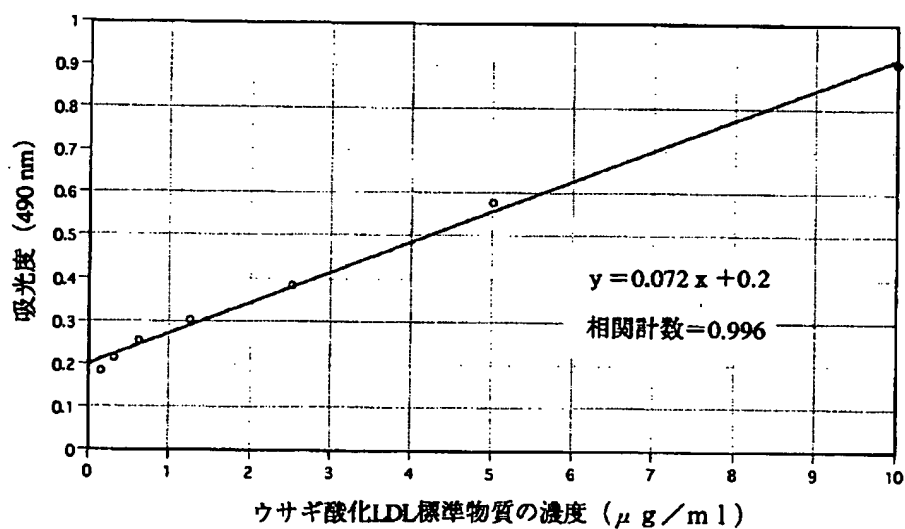
【図3】



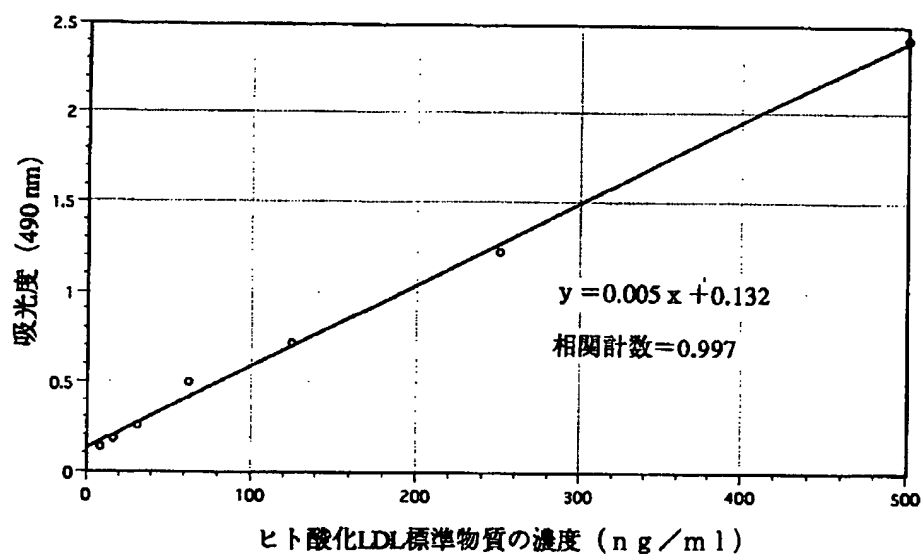
【図6】



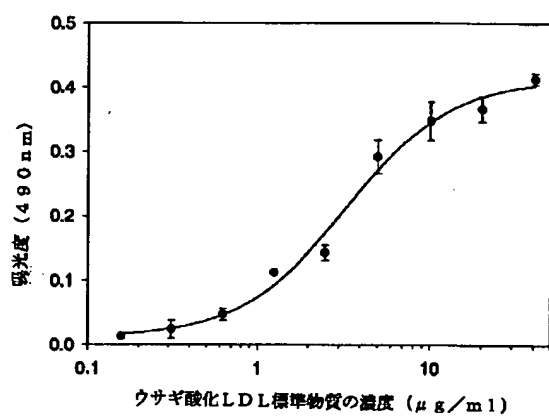
【図4】



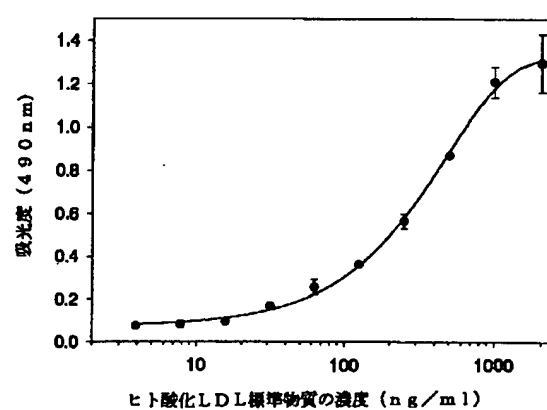
【図5】



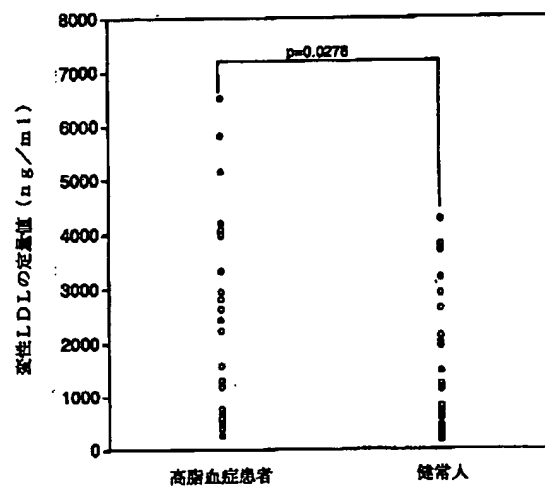
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 07 K 1/22		C 07 K 14/705	4 H 04 5
		16/46	
		17/00	
		19/00	
C 12 N 5/10		C 12 P 21/02	C
C 12 P 21/02		G 01 N 33/53	W
G 01 N 33/53		C 12 R 1:91	
/(C 12 N 15/09	Z N A	(C 12 P 21/02	C
C 12 R 1:91)		C 12 R 1:91)	
(C 12 P 21/02		A 61 K 37/02	
C 12 R 1:91)		C 12 N 5/00	B
		(C 12 N 15/00	Z N A A
		C 12 R 1:91)	

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA53 BA61
BA63 CA04 CA07 DA02 EA04
GA11 GA13 HA11
4B064 AG20 AG26 AG27 CA10 CA19
CC24 DA01 DA13 DA20
4B065 AA90X AA90Y AB01 AB05
AC14 BA02 BA08 CA24 CA25
CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 AA06 AA07 BA01
BA22 BA41 BA44 CA18 CA20
DA39 DC50 ZA452 ZC332
4C085 AA13 AA14 AA17 AA18 BB13
BB33 BB34 BB35 BB36 DD63
DD88 GG02 GG03 GG04 GG05
GG06 GG08
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
BA41 CA40 DA50 DA75 DA76
EA24 EA50 EA61 FA72 FA74
FA80 HA05 HA06